

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1932-1933

N° 6

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DES
PROTÉINES SÉRIQUES

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le janvier 1933

PAR

HO DAC AN

Pharmacien

Ancien interne des Hôpitaux de Paris

Licencié ès sciences

Ancien élève à l'Institut Pasteur

JURY { MM. COUTIÈRE, *Président.*
LAUNOY, *Agrégé.*
RÉGNIER, *Agrégé.*

PARIS

LIBRAIRIE LE FRANÇOIS

91, BOULEVARD SAINT GERMAIN, 91

1933



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1932-1933

N° 6

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PROTÉINES SÉRIQUES

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE

Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le janvier 1933

PAR

HO DAC AN

Pharmacien

Ancien interne des Hôpitaux de Paris

Licencié ès sciences

Ancien élève à l'Institut Pasteur

JURY { MM. COUTIÈRE, *Président.*
LAUNOY, *Agrégé.*
RÉGNIER, *Agrégé.*

PARIS

LIBRAIRIE LE FRANÇOIS

91, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 91

1933

Personnel de la Faculté de Pharmacie

ADMINISTRATION

MM. GUÉRIN, *Doyen*, *, * I.
LEBEAU, *Assesseur*, O. *, * I.
P. DESPORT, *Secrétaire*, *, * I.

PROFESSEURS

MM. GUÉRIN, *, * I.	Botanique générale.
BÉHAL, Membre de l'Institut, G. O. *, * I.	Chimie organique.
PERROT, O. *, * I.	Histoire naturelle des Médicaments.
COUTIÈRE, O. *, * I.	Zoologie.
LEBEAU, O. *, * I.	Pharmacie chimique.
BOUGAULT, *, * I.	Chimie analytique.
GORIS, *, * I.	Pharmacie galénique.
TASSILLY, *, * I.	Physique.
DAMIENS, *, * I.	Chimie minérale.
HÉRISSEY, O. *, * I.	Chimie biologique.
SOMMELET, *, * I.	Hydrologie et Hygiène.
LUTZ, O. *, * I.	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, *, * I.	Toxicologie.
LAUNOY, O. *, * I.	Professeur sans chaire.

* *Doyen honoraire* : M. RADAIS, O. *, * I.

Professeurs honoraires : MM. DÉLÉPINE, O. *, * I. et GUERBET, O. *, * I.

CHARGES DE COURS

MM. MARC HONNORAT, *, * I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LAUNOY, O. *, * I.	Pharmacodynamie.
DELABY, *, * I.	Minéralogie.
PICON, * I.	Chimie minérale.
BACH, * I.	Microbiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, *, * I.	MM. MASCRÉ, * I.	MM. BEDEL, * I.
PICON, * I.	FLEURY, * I.	RÉGNIER, * I.
	BACH, * I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, * I., agrégé chargé des T. P. de 1 ^{re} année.	Chimie générale.
FLEURY, * I. et RÉGNIER, * I., agrégés, chargés des travaux de	Chimie analytique.
SOUÈGES, * I.	Micrographie.
LEROUX, * I.	Physique.
DEVAL, *, * I.	Microbiologie.
DELABY, *, * I., PICON, * I. et MASCRÉ, * I. : agrégés, chargés des Travaux généraux de 4 ^e année.	

Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, * I.



A MONSIEUR LE PROFESSEUR ACHARD

Membre de l'Institut
Secrétaire perpétuel de l'Académie de Médecine.

*En témoignage de ma profonde et respec-
tueuse reconnaissance.*



A MONSIEUR LE PROFESSEUR COUTIÈRE

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris
Membre de l'Académie de Médecine

*Hommage de vive reconnaissance pour
avoir bien voulu m'honorer en acceptant la
présidence du Jury lors de la soutenance
de cette thèse.*

A MON MAITRE

MONSIEUR MAURICE PIETTRE

Docteur ès-sciences
Directeur du laboratoire des Halles Centrales de Paris
Membre de l'Académie d'Agriculture

En témoignage d'affectueuse reconnaissance.

A MONSIEUR AUG. BOUTARIC

Professeur à la Faculté des Sciences de Dijon

Hommage de vive gratitude.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PROTÉINES SÉRIQUES

INTRODUCTION

**Exposé de l'état actuel de la question
des protéines sériques aux points de vue physique, chimique
et physico-chimique. Résultats des dernières recherches.**

Dès 1929 Le Professeur Achard a eu le grand mérite d'introduire en pathologie médicale l'étude des protéines du sérum et des divers liquides biologiques ainsi que le dosage de ces matières au cours des différents processus pathologiques.

Sous cette active impulsion de nombreux travaux (thèses de doctorat, notes, communications) se sont multipliés ouvrant ainsi une voie féconde aux laboratoires des Hôpitaux.

Parmi les recherches importantes, il faut citer les travaux initiaux de Piettre et Vila, Piettre, Achard et Boutaric, Achard et Piettre, Achard et ses nombreux collaborateurs et élèves Arcand, M^{lle} Jeanne Lévy, Doladhile, Boutroux, M^{lle} Gautherot et nous-même.

Ces travaux ont eu pour point de départ un nouveau procédé de séparation des protéines par la méthode à l'acétone imaginée par Piettre et Vila à la suite des travaux commencés à l'Institut Pasteur au laboratoire de M. Etard, interrompus pendant la guerre et repris en 1918 jusqu'à 1920. Ils ont été continués surtout par M. Piettre, d'abord

à Rio de Janeiro de 1920 à 1924 puis au Laboratoire des Halles Centrales de Paris où nous avons reçu, sous la recommandation de notre illustre Maître le Professeur Achard, un si bienveillant accueil pour l'accomplissement de cette thèse.

Laissant de côté les différences essentielles déjà exposées dans la thèse d'Arcand, entre la technique allemande dite aux sels, de Hofmeister, Hofmann, Starke, etc... et la technique française à l'acétone qui a le très précieux avantage de donner très aisément des corps purs et d'être une véritable technique analytique de tous les constituants qui accompagnent les protéines, nous avons cru plus profitable d'établir le bilan des plus importants résultats obtenus avec ces différentes méthodes pour la connaissance des protéines dans le domaine physique, chimique et physico-chimique.

La chimie physique des protéines s'est révélée comme une science remarquablement féconde depuis le jour où Hardy a introduit la conception du point isoélectrique. (1)

Ce savant a remarqué en 1889 que le blanc d'œuf dilué de 8 à 9 fois son volume d'eau puis filtré et chauffé à l'ébullition se meut, quand on le porte dans un champ électrique dans des directions opposées suivant que la réaction du milieu est acide ou alcaline. Mais quand le liquide est neutre le mouvement des particules est si faible qu'il est difficile de le mettre en évidence. A ce moment les particules et le liquide qui les baignent sont dits « *isoélectriques* ».

Quand les méthodes de mesure de la *concentration des ions d'hydrogène* furent découvertes et mises au point par Sørensen et Friedenthal (2) de nombreux auteurs se mi-

1. W. Kopaczewsky a montré cependant que la notion de point isoélectrique doit être modifiée : « le point isoélectrique n'est pas fixe, et il n'est pas le seul », il faudrait donc substituer à ce point « des zones de labilité des colloïdes ». *Protoplasma*, t. XIII, n° 2, 1931.

2. Sørensen (S. P. L.), *Studies on proteins*. Compte rendu trav. Lab. Carlsberg, t. XII. Copenhague, 1915-1917.

rent à déterminer sur diverses protéines ce point isoélectrique. Michaelis (1) en particulier le définit : la concentration d'ions H pour laquelle les particules ne vont ni vers l'anode ni vers la cathode et sont indifférents à l'action des acides ou des bases.

Mais si l'influence des ions H et OH sur la migration des particules fut reconnue expérimentalement il restait à expliquer cette influence.

A cet égard deux théories furent émises et défendues avec une égale ardeur :

Les uns, comme Hardy et Perrin (2), admettent que les ions H et OH exercent leur action sur la *charge électrique* des particules protéïniques par un processus physique d'adsorption élective.

D'autres tels que Loeb, Sørensen, substituent à cette interprétation physique une théorie purement chimique d'après laquelle les protéïnes de réaction amphotère, ne doivent pas la charge électrique qu'elles empruntent aux ions de la solution, à un phénomène d'adsorption mais à la *formation* réelle des sels (protéïnates ou sels de protéïnes) par combinaison chimique avec les acides et les bases suivant la loi des « proportions définies ». Ces sels se dissociant ensuite ou mieux au moment même où ils se forment dans l'eau comme les colloïdes minéraux, libèrent des ions colloïdaux et simples qui suivent les lois de l'électrolyse.

Pour justifier sa théorie, Jacques Loeb s'est basé quelque peu arbitrairement comme il est reconnu aujourd'hui, sur la théorie aujourd'hui contestée des *équilibres de membranes de Donnan* par laquelle il explique quantitativement et mathématiquement les principales propriétés colloïdales des solutions de protéïnes (charge électrique, viscosité, pression osmotique etc.).

D'autre part, il a cherché expérimentalement les varia-

1. Michaelis (L.), *Die Wasserstoffionenkonzentration*, p. 54. Berlin, 1914.

2. Perrin, *J. Chim. Physique*, t. II, p. 601, 1904 ; t. III, p. 50, 1905.

tions de pH dans les solutions de protéines, portées au point isoélectrique, puis additionnées de liqueurs titrées acides et alcalines. La formation de sels de protéines et de protéinates alcalins devait se traduire par des modifications des courbes *d'ionisation* des acides ou des bases considérées seules c'est-à-dire en l'absence des protéines.

Voici parmi ses nombreuses expériences, une des plus typiques : (1) Partant d'une solution à 1 % d'ovalbumine cristallisée de Sørensen préalablement ramenée à son point isoélectrique il y ajoutait des volumes connus de plus en plus grands d'une solution $\frac{N}{10}$ d'acide ou de base puis suivait les variations du pH et pour contrôle celles du pCl.

Par comparaison les déterminations du pH et du pCl étaient faites dans un même volume d'eau, recevant les mêmes volumes d'acide ou d'alcali $\frac{N}{10}$ et à la même température. Sur les deux courbes obtenues, des différences de pH constatées étaient interprétées comme résultant d'une fixation d'ion Cl ou d'ion métallique sur la protéine et, le calcul permettait de préciser le pourcentage de la combinaison chlorhydrate de protéine ou protéinate métallique.

Les différences de pH entre la solution sans ovalbumine et la solution avec ovalbumine étaient interprétées comme une fixation de HCl sur l'ovalbumine pouvant être exprimée en une relation pondérale.

Portant en abscisses les valeurs de pH et en ordonnées le nombre de centimètres cubes de HCl $\frac{N}{10}$, pour 100 centimètres cubes de sérum albumine à 1 %, il obtenait la courbe de titrage (voir page 5).

La conclusion dégagée par Loeb de ses nombreux travaux exposés dans deux volumes (2) était que la *chimie*

1. Loeb (J.), *Les Protéines*. Traduit de l'anglais par H. Mouton, p. 86 et suivantes. Nouvelle collection scientifique. Libr. Félix Alcan.

2. Loeb (J.), *La théorie des phénomènes colloïdaux*. Traduit de l'anglais par H. Mouton. Nouvelle collection scientifique. Libr. Félix Alcan.

des protéines devrait être considérée comme un simple chapitre de la chimie des cristalloïdes où les combinaisons sont régies par la loi des proportions définies.

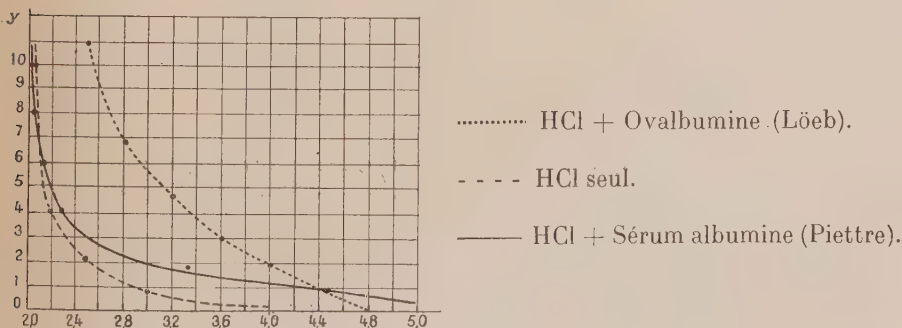
En 1928 à l'Académie des Sciences une note très importante de Maurice Pieltre a tout remis en question, en montrant l'absence de pouvoir tampon des substances protéïdiques à l'état de pureté. Déjà en 1921, W. Kopaczewski (1) avait montré l'insuffisance des conceptions de J. Loeb dans une publication très documentée. Par la suite ses critiques ont été confirmées par de nombreuses constatations expérimentales (Dhéré, W. Oswald, etc. etc.).

Disposant des grands avantages apportés par la méthode à l'acétone qui permet d'obtenir des protéines pures M. Pieltre a repris les expériences de Loeb et obtenu des résultats tout à fait différents : (2).

Partant d'un sérum albumine purifiée soigneusement par 5 précipitations acétoniques successives il a reproduit les expériences de Lœb en se plaçant dans les mêmes conditions expérimentales indiquées plus haut.

Les pH étaient mesurées par la méthode potentiométrique avec l'électrode de Sørensen.

Voici le diagramme obtenu :



1. W. Kopaczewski, *Revue générale des sciences*, 1921.

2. M. Pieltre: C. R. t. 186, p. 1657 (1928):

Des constatations de même ordre ont été faites avec $\text{NaOH } \frac{\text{N}}{10}$ aussi bien pour la sérum albumine que pour la sérum globuline.

Ces résultats sont très nettement opposés à la conception de l'existence des combinaisons des protéines avec les acides et les bases.

Ils ont établi en outre comme conséquence immédiate un fait nouveau important à savoir que les *protéines ne sont pas des corps tampons* contrairement à l'opinion classique. Cette propriété dans le sérum sanguin doit être réservée aux matières minérales, phosphates, équilibres acide carbonique, carbonates etc. contenus dans la phase dispersante.

Les recherches chimiques sont venues appuyer ces conclusions nouvelles fort intéressantes pour la biologie.

En effet Piettre, en appliquant à l'étude des protéines pures, la méthode de titration au formol de Sørensen, a obtenu des teneurs en azote amidé et ammoniacal très faibles.

Voici une série de chiffres cités dans la même note.

Sérum albumine	Azote amidé et ammoniacal %
0 gr. 973	0,59
0 gr. 0547	0,43
0 gr. 2103	0,61
0 gr. 1220	0,53
Sérum globuline	Azote amidé et ammoniacal %
0 gr. 2732	0,35
0 gr. 1120	0,41
0 gr. 2053	0,38
0 gr. 0974	0,31

D'autre part la détermination du pourcentage de l'azote libéré à l'état ammoniacal par la méthode de Froidevaux

lui a donné pour la sérum albumine et la globuline des chiffres très peu importants :

Sérum albumine	0,41 %
Sérum globuline	0,206 %

Ces chiffres montrent cependant comme plus haut de petites différences entre les deux protéines. La sérum albumine aurait donc une très légère basicité soulignée déjà par M. Piettre, en se basant sur le pH de ses solutions aqueuses ($\text{pH} = 6,3$).

Il concluait que dans la molécule protéidique tous les groupes peptidiques (qui en représentent pondéralement environ 70 %) ont leurs fonctions amines ou carboxyles non libres mais liées, comme on le savait déjà, par formation d'anhydride (liaisons peptidiques) faisant du squelette de la molécule protéidique une chaîne fermée (molécule cyclique).

Au point de vue biologique l'*inertie physique et chimique* des deux principales protéiques sériques vis-à-vis des acides ou des bases alcalines garantit à l'équilibre humoral une précieuse stabilité qui pourrait être troublée à chaque instant par des phénomènes de dispersion ou de floculation.

Enfin la *notion de pH*, véritable constante du sérum sanguin puisqu'il se maintient étroitement autour de $\text{pH} = 7,2$, doit être rapportée à la *phase dispersante et non à la phase dispersée* de ce milieu.

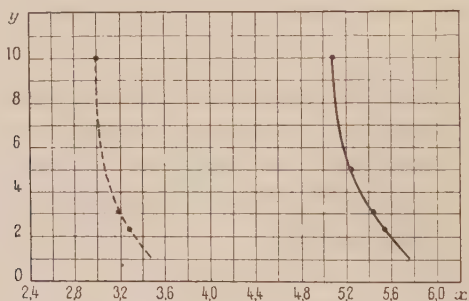
Dans une nouvelle note (1) M. Piettre a précisé très heureusement un point resté obscur ; ce point concerne une partie de la courbe des pH en présence d'HCl. A l'origine en effet entre $\text{pH} = 5$ et $\text{pH} = 3$, la courbe correspondant au mélange acide et albumine s'éloigne assez nettement de la courbe d'ionisation de HCl seul. On pouvait se deman-

1. M. Piettre, C. R. A. S., 13 avril 1934.

der si dans ces zones de faibles concentrations en HCl, il ne se produisait pas une combinaison de l'HCl et de protéine (chlorhydrate d'albumine).

Il a donc étudié l'ionisation de très faibles quantités d'HCl ($\frac{N}{500}$ à $\frac{N}{4000}$) en présence de sérum albumine en substituant à la méthode potentiométrique insuffisamment sensible, pour des liqueurs à grande résistance, la *méthode balistique* pour les mesures de forces électromotrices, déjà appliquée par H. T. Beans et E. T. Oakes et perfectionnée par Lassieur.

Les résultats obtenus sont consignés dans le diagramme suivant comprenant à gauche la courbe de dissociation ionique de HCl seul, et à droite la courbe du mélange HCl + sérum albumine.



Comme on le voit très nettement, il y a un décalage considérable de $\text{pH}^* = 3$ à $\text{pH} = 5$, que l'auteur explique, après avoir écarté pour une grande part toutes les autres possibilités, par une *adsorption* de l'acide en liqueur très étendue par la sérum albumine. L'acide disparaissant progressivement de la solution, l'albumine se comporte comme si elle était seule dispersée dans l'eau.

Les recherches chimiques viennent appuyer cette interprétation; on sait en effet que lorsqu'on ajoute aux solutions ou suspensions de protéines même aussi purifiées que

possible des acides ou des bases très étendues pour ne pas s'y combiner ou les attaquer on constate, en présence des indicateurs colorés, une disparition plus ou moins importante de ces électrolytes. C'est ce qui se produit ici pour la sérum albumine.

Ces recherches établissent donc que les protéines comme les différents colloïdes sont capables d'adsorber électrolytes et non électrolytes. Et ces phénomènes d'adsorption expliquent le déplacement de la courbe de droite du diagramme. Ils sont masqués quand on expérimente avec des concentrations acides fortes et ne deviennent perceptibles, mesurables que pour des concentrations faibles.

Comme toute méthode générale, la méthode à l'acétone en raison de la voie très féconde qu'elle ouvre dans toutes les domaines de la science biologique et chimique, a soulevé des objections.

On lui a opposé la méthode allemande aux sels qui a certes donné des résultats intéressants mais qui, en raison des produits qui en dérivent et sont souillés d'électrolytes, a aiguillé en maintes circonstances la chimie physique des colloïdes biologiques dans des voies erronées et rendu caduques bien des travaux de grande envergure.

L'objection la plus digne d'attention reposait sur les possibilités de *dénaturation*, de *condensation*, par déshydratation, des protéines, pendant les différents traitements à l'acétone. Avant qu'elle ne fût faite, Piettre et Vila s'étaient rendu compte qu'une condensation partielle était possible à la température du laboratoire ou dès qu'on s'éloigne des concentrations en acétone bien précisées, lors de leurs premières recherches, et c'est certainement ce qui explique que l'existence de la myxoprotéine n'a pu être constatée que plus tard par M. Piettre travaillant rigoureusement aux environs immédiats de 0° et dans ces concentrations acétoniques. Ils s'étaient donc préoccupés très

vite de déterminer les conditions d'une telle condensation pour la limiter et peut-être pour l'éviter totalement.

M. Vila dans une note (1) a mis parfaitement au point cette très importante question en étudiant systématiquement les variations de la viscosité du sérum floculé par l'acétone ou l'alcool en proportions déterminées puis repris par le volume initial d'eau contenant l'extrait acétonique ou alcoolique aqueux, en fonction de la température de floculation et du temps de contact avec l'acétone ou l'alcool.

Voici les résultats obtenus :

TABLEAU I

Durée d'action des dissolvants	Sérum	
	acétoné (η)	alcoolé (τ)
Après contact instantané à — 10 °C	1,95	»
1 h. contact	2	»
2 h. »	1,94	»
4 h. »	1,90	2,56
Contact instantané à 18° C	1,95	3,48

La même communication contient une courbe fort intéressante à étudier des variations de viscosité en fonction de différentes variables.

On remarquera les viscosités supérieures des sérums floculés par l'alcool ce qui justifie le choix de l'acétone de préférence à ce dernier solvant.

Soumises aux mêmes mesures les protéines de ce même sérum se sont comportées d'une façon analogue.

M. Vila concluait que l'action coagulante de l'acétone, analogue à un effet thermique, peut être atténuée et même évitée en prenant certaines précautions (concentration minima en acétone, abaissement de la température du milieu, rapidité des manipulations en présence de solvant, élimination aussi complète que possible de l'acétone).

1. Vila, C. R. A. S., t. 174, p. 1136, 1922.

Plus tard, en 1930, Sörensen lui-même a fait justice de cette objection au cours d'un important travail sur « the constitution of soluble protéines » (1). Il déclare qu'on peut, *à basse température et sans dénaturer sensiblement les protéïnes*, extraire assez complètement les lipides du sérum de cheval en précipitant les protéïnes par de l'alcool puis en les épuisant par un mélange d'alcool et d'éther. Et nous avons vu que les chances de condensation sont bien plus grandes avec l'alcool qu'avec l'acétone.

La démonstration la plus convaincante vient d'être donnée par une série de travaux par MM. Achard et Boutaric, Achard-Boutaric et Doladihle, Achard-Boutaric, M^{lle} Gautherot (2).

Elle repose sur l'étude physico-chimique des modifications qui ont lieu dans les milieux colloïdaux. M. Boutaric a imaginé un procédé pour mesurer, dans une suspension colloïdale, le nombre de particules rapportées à 1 gr. de matière sèche. Ce procédé repose sur les mesures combinées de l'absorption lumineuse et de la viscosité. Il arrive à établir un rapport appelé ω de la forme.

$$\omega = \frac{1}{h} \left(\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \right)$$

dans laquelle, h représente le coefficient d'absorption lumineuse et η la viscosité.

Appliquant cette méthode à l'étude de la dispersion granulaire comparativement dans un sérum donné et dans la solution de protéïnes extraites à 0° par la méthode à l'acétone, MM. Achard et Boutaric et leurs collaborateurs (3) ont constaté que cette dispersion était pratiquement identique aux différentes températures. Voici, parmi de nom

1. Sörensen, C. rendu du Laboratoire de Carlsberg, 18, n° 5, p. 1-124.

2. Boutaric, C. R. Acad. Sc., 192, 1930, p. 1332.

3. Achard, Boutaric, Doladihle, C. R. Acad. Sc., t. 193, p. 27. Séance 3 août 1932.

breuses autres, quelques déterminations du facteur ω pour le sérum et les protéines extraites, par Piettre dans son Laboratoire frigorifique expérimental, d'un *sérum normal* :

Sérum entier de bœuf	Facteur ω
—	—
26°	7,14
57°	7,20
63°	7,13
Protéines séparées par la méthode à l'acétone	
—	—
26°	7,56
57°	7,51
63°	7,68

En outre ils ont constaté (1) la même relation dans l'étude de nombreux *sérums pathologiques* et en particulier dans les sérums de malades atteints de néphrose lipoïdique. Le facteur ω diminue en effet sensiblement de la même façon comme l'indiquent ces quelques chiffres (sérum et protéines de néphrose lipoïdique :))

	Sérum	Protéines totales
	—	—
Temp. 26°	1,60	»
Après 1 h. de chauffe à 50°.....	1,70	»

Cette relation est particulièrement intéressante dans cet état pathologique puisqu'elle met en lumière à la fois dans le sérum et dans les protéines extraites à 0°, un fait curieux, une grande aptitude des particules à s'hydrater en fonction de la température. Poussant plus loin cette délicate question de l'identité de l'état physique entre les protéines d'un sérum et ces mêmes protéines séparées par la

1. Achard, Boutaric, C. R. Acad. Sc., t. 192, p. 1611. Séance du 22 juin 1931.

méthode à l'acétone, M. Boutaric vient de consacrer dans un très remarquable travail qui sera publié par la Revue universelle le « Protoplasma » et dont il a bien voulu nous réserver la primeur en nous communiquant très aimablement la conclusion générale suivante :

Il a étudié :

1^o La *viscosité* relative par rapport à l'eau $\frac{\eta}{\eta_0}$, la *densité optique* h d'où le quotient $\omega = \frac{1}{h} \left(\frac{\eta}{\eta_0} - 1 \right)$, qui fournit une mesure relative du nombre de particules correspondant à un même poids de protéïnes prises à l'état sec ;

2^o L'*influence accélératrice* qu'exerce sur la floculation de l'hydrate ferrique, l'addition en proportions très faibles, de sérums ou de suspensions de leurs protéïnes.

3^o La *tension superficielle statique* mesurée avec le tensiomètre de M. Lecomte du Nouy, de solutions très déluées des sérums ou des suspensions de leurs protéïnes et la fixation, dans les deux cas, des micelles protéïdiques par du graphite ou du charbon de sucre en poudre fine ce qui permet de comparer les dimensions de ces molécules.

Toutes ces propriétés prennent *exactement les mêmes valeurs pour les sérums et pour les suspensions obtenues à partir des protéïnes séparées de ces sérums par la méthode à l'acétone*, alors cependant que la plus légère altération des protéïnes notamment par le chauffage au-dessus de 55° ou par le fait d'états pathologiques, entraîne une modification très nette de ces propriétés. Ainsi ces diverses techniques ont elles conduit M. Boutaric à conclure que la *séparation des protéïnes effectuées à basse température par la méthode dite à l'acétone développée et généralisée par Piettre respecte l'intégrité des micelles protéïdiques*.

Il faut se garder cependant des généralisations trop hâtives. Si les protéïnes sériques échappent très heureusement dans des conditions bien précises à toute dénatura-

tion par l'acétone, il n'en est pas de même des particules d'une protéine d'un groupe voisin (glycoprotéide), de la *mucine des synoviales articulaires ou tendineuses* isolée et étudiée par MM. Achard et Piettre (1).

La détermination du facteur ω a montré une différence nette entre le liquide articulaire et la mucine isolée, même à basse température, par le procédé à l'acétone.

Les opacités lumineuses diminuent pendant que la viscosité augmente entraînant un accroissement du facteur ω .

Enfin, il est un gros faisceau de faits qui plaident en faveur de la non dénaturation des protéines séparées à froid par la méthode à l'acétone, ce sont ceux mis en lumière dans le domaine de la sérologie, par M. Piettre, dans ses très importantes recherches sur les sérums thérapeutiques, tant à Rio de Janeiro qu'à Paris. Ces recherches établissent que le *traitement à l'acétone d'immusérums ne s'accompagne pratiquement d'aucune perte du pouvoir spécifique du sérum mis en œuvre*. Le titrage des anticorps d'immusérum se retrouve, en effet, identique dans les protéines isolées, bien plus ces mêmes anticorps se retrouvent, aux erreurs d'expérience près, localisés dans les protéines séparées les unes des autres.

C'est ainsi que dans les *immusérums antitoxiques* (antidiphthérique, antitétanique, antiophidique), les anticorps spécifiques accompagnent la sérum albumine purifiée (2). Il en est de même pour les *sérums hémolytiques* (3). Par contre pour les *sérums précipitants* (4) les précipitines se retrouvent dans la sérum-globuline.

1. Achard et Piettre, C. R. Acad. Sciences, t. 194, p. 221, séance du 18 janvier 1932.

2. M. Piettre, *Archivos do Instituto Vital Brazil*, t. 1. fascicule 1 (1923) et t. 2. fasc. 2 (1924).

3. Piettre et Chrétien, *Étude biochimique de l'hémolyse* (1927).

4. M. Piettre, *Immusérums précipitants in Bulletin Académie de Médecine*, t. XCII, n° 35 (1924).

Enfin pour les *sérums agglutinants* (1), suivant la phase d'immunisation, les agglutinines accompagnent d'abord la sérum-globuline puis s'accumulent dans la sérum albumine.

Dans la *réaction de Wassermann* (2), les composés spécifiques se localisent presque intégralement dans la sérum globuline et phénomène tout à fait impressionnant la floculation au Vernes donnerait sensiblement les mêmes mesures avec la sérum globuline qu'avec le sérum entier (Communication verbale de M. Boutroux).

On est donc en droit de conclure que si le traitement à l'acétone dénaturait à un degré quelconque les protéines, les propriétés spécifiques des immusérums, que l'on s'accorde à regarder jusqu'ici comme extrêmement délicates, devraient être atteintes, diminuées d'activité et sans doute même supprimées.

L'ensemble des données purement expérimentales nous semble suffire à conclure que la méthode à l'acétone telle qu'elle a été mise au point par M. Piettre mais susceptible encore d'amélioration technique, peut servir de base solide pour l'étude des protéines sériques en particulier et des colloïdes biologiques en général.

On lui doit déjà des résultats précieux parmi lesquels la cristallisation (3) de la sérum albumine par Piettre dans le domaine théorique, et au point de vue médical des connaissances précieuses sur les variations des protéines et et leurs modifications physiques dans un certain nombre d'états pathologiques si bien mis en lumière par les travaux de M. Achard, Achard et Boutaric et leurs collaborateurs.

Il nous est un agréable devoir de témoigner notre très profonde et respectueuse reconnaissance à M. le Profes-

1. Piettre et Chrétien, *Etude biochimique de l'agglutination* (1929).

2. M. Piettre, *Archives de l'Institut Vital Brazil*, loc. cit.

3. M. Piettre, *C. R. Acad. Sciences*, 186, p. 463 (1929).

seur Achard de nous avoir témoigné sa grande bienveillance et de nous avoir guidé dans ce travail qui, sans les conseils éclairés de M. Piettre au Laboratoire des Halles centrales de Paris, de M. A. Boutaric dans son Laboratoire de physique de la Faculté de Dijon, aurait été bien au-dessus de nos forces.

PLAN DU TRAVAIL

Exposé de l'état actuel de la question des protéines sériques au point de vue physique, chimique et physico-chimique. Résultats des dernières recherches.

PREMIÈRE PARTIE

Mise au point de la méthode à l'acétone pour l'étude des protéines du sérum et en particulier de la myxoprotéine.

CHAPITRE I. — *Rappel sommaire des principes sur lesquels repose la technique initiale de MM. Piettre et Vila 1919-1920.*

CHAPITRE II. — *Recherches expérimentales dans les sérums normaux, sur quelques points particuliers de la méthode à l'acétone modifiée à partir de 1924 par M. Piettre en vue de sa généralisation à l'étude des sérums pathologiques, des immusérums et des liquides biologiques.*

- 1° Influence de la dilution sur la floculation de la globuline.
- 2° Influence de la dilution sur la floculation de la myxoprotéine.
- 3° Relations (a) entre la teneur en protéines sériques et l'alcalinité retenue par ces substances après précipitation acétonique et l'alcalinité totale du sérum, (b) entre les extraits secs, la teneur en protéines et l'alcalinité des sérums normaux et pathologiques.
- 4° Des émulsions en milieu acétonique aqueux.

DEUXIÈME PARTIE

Étude de la myxoprotéine.

CHAPITRE I. — *Préparation.*

- A) Par précipitation acétonique.
- B) Par dialyse aqueuse directe.

- 1° sur le sérum total ;
- 2° sur les protéines totales ;
- 3° sur les protéines débarrassées de la globuline.

C) Par électrodialyse.

Comparaison des résultats. Rendements.

CHAPITRE II. — *Etude Chimique.*

Description de la matière : à l'état frais ; après dessiccation au vide sulfurique.

Propriétés physiques : action de la chaleur, acides, bases. Solubilité dans l'eau ; Solubilité dans les électrolytes ; Propriétés colloïdales.

Etude de la solubilité : A) dans l'eau : principe de la méthode : résultats.

B) dans divers sels neutres : principe de la méthode de saturation — technique opératoire — Résultats. Remarque générale sur la solubilité des colloïdes.

Réactions générales des protides :

a) Coloration ;

b) Précipitation.

Résultats.

Composition élémentaire.

CHAPITRE III. — *Etude physico-chimique.*

I. — FLOCCULATION.

Exposé de la méthode du Professeur A. Boutaric : principe de la technique expérimentale.

Application à l'étude de la floculation de la Myxoprotéine.

A. — *Par les électrolytes* : Préparation des sols de myxoprotéine.

Floculation par les électrolytes à cation mono et polyvalent par les acides. Résultats ; Courbes de floculation ; Conclusions.

B. — *Par les colloïdes hydrophobes* :

$\text{As}^2 \text{S}^3$, $\text{Fe}^{+6} \text{Cu}^2$, $\text{Fe}^2 (\text{OH})^6$.

II. — VISCOSITÉ.

Principe de la méthode ; appareil, technique expérimentale. Détermination de la viscosité en fonction de la température, de la concentration en myxoprotéine.

III. — FACTEUR ω .

Principe ; technique expérimentale.

IV. — ELECTROPHORÈSE.

Principe ; technique expérimentale.

V. — FIXATION DES MATIÈRES COLORANTES.

Principe ; technique.

Résultats comparatifs pour la myxoprotéine et la sérumglobuline.

PREMIÈRE PARTIE

Mise au point de la méthode à l'acétone pour l'étude des protéines du sérum et en particulier de la myxoprotéine

CHAPITRE PREMIER

RAPPEL DES PRINCIPES SUR LESQUELS EST BASÉE LA MÉTHODE A L'ACÉTONE

Cette première partie de notre travail est surtout consacrée à l'étude plus approfondie de quelques points particuliers de la méthode à l'acétone en vue d'une amélioration de la technique d'une part et d'autre part afin de séparer dans des conditions plus favorables l'une des protéines sériques, la myxoprotéine.

EXPOSÉ DE LA MÉTHODE A L'ACÉTONE. — Le principe et les détails techniques de cette méthode ont déjà été exposés dans l'excellente thèse de notre collègue Arcand sur les « Protéines des humeurs » (1). Nous nous bornons à en résumer les principales phases :

La méthode à l'acétone basée essentiellement sur une

1. A. Arcand; thèse de doctorat en pharmacie. Paris, 1930.

déminéralisation et une élimination des lipides aussi poussée que possible, comprend trois étapes principales :

1^o Précipitation des protéines totales s'accompagnant d'une élimination importante des matières minérales et des substances lipidiques.

2^o Flocculation de la globuline.

3^o Séparation de la myxoprotéine d'avec la sérum albumine.

PREMIÈRE PHASE (*Précipitation des protéines totales*). — Elle s'obtient de la façon suivante : le sérum à traiter bien refroidi aux environs de 0° est additionné peu à peu en agitant fortement, de deux fois et demi son volume d'acétone purifiée passant à 56-57° et préalablement refroidie à 0°. On laisse reposer quelques instants au froid, puis essore sur Buchner en décantant d'abord la partie claire. Une fois le gâteau des protéines bien égoutté, on le malaxe avec soin à l'aide d'une spatule flexible, sur le filtre de porcelaine lui-même, à deux reprises, avec de l'acétone froide de façon à bien enlever l'eau et avec elle les sels minéraux et surtout les substances lipoïdiques. Enfin on continue l'élimination de certains lipides (oléate et palmitate de cholestérine) et les restes d'acétone par une série de lavages à l'éther sec. Il reste finalement une masse blanche se réduisant aisément en une poudre qu'il reste à traiter pour la séparation des différentes protéines.

DEUXIÈME PHASE (*Flocculation de la sérum globuline*). — La flocculation de cette protéine est effectuée sur la solution aqueuse des protéines totales. Cette solubilisation a lieu en mettant en contact la poudre blanche avec un volume connu d'eau sensiblement égal au volume du sérum initial. Il se produit un gonflement, puis une dispersion rapide sans qu'il soit besoin d'intervenir autrement que par de rares

agitations. Les protéines une fois complètement dispersées dans l'eau distillée (1) on fait un volume de préférence supérieur d'un tiers au volume mis en œuvre, puis on détermine dans les tubes à hémolyse, sur 6 ou 7 prises d'essais de 0 cmc,5 la quantité $\text{HCl } \frac{N}{100}$ qui provoque la précipitation complète de la globuline sous l'aspect de gros flocons blancs se déposant rapidement pour laisser un liquide surnageant parfaitement limpide. On calcule alors le volume d'acide $\frac{N}{10}$ ou $\frac{N}{1}$ à ajouter au reste de la liqueur protéinique préalablement refroidie et saturée d'éther. M. Piettre avait conseillé au début cette saturation préalable d'éther pour réduire au minimum la dilution aqueuse la plus favorable à la floculation de la globuline. L'addition d'acide s'accompagne d'un volumineux précipité de globuline qui se dépose en quelques minutes. On décante la liqueur claire, centrifuge le dépôt, lave ensuite à plusieurs reprises avec de l'eau distillée, la première eau tout au moins étant jointe à la liqueur claire.

Suivie au potentiomètre hydrogène la floculation de la globuline a lieu, suivant Piettre, entre $\text{pH} = 9,04$ (protéines pures, puis 7,27, 6,68 — 5,94 et $\text{pH} = 5,21$ début de redispersion de la globuline par l'acide en leurs excès).

La globuline ainsi séparée peut être purifiée par des dispersions alcalines ou acides suivies de neutralisations correspondantes.

TROISIÈME PHASE (*Séparation de la myxoprotéine d'avec la sérum albumine*). — Elle s'obtient en précipitant à froid la liqueur claire débarrassée de globuline par un volume au plus égal d'acétone froide (2). Le précipité acétonique centrifugé

1. Il convient d'éliminer par centrifugation les traces de fibrinogène qui auraient pu rester dans le sérum ainsi que les traces de résidus celluloseux provenant du filtre.

2. M. Piettre avait essayé de séparer la myxoprotéine de la sérum-albumine par dialyse aqueuse qui enlève les électrolytes mais le rendement lui avait alors paru insuffisants.

à froid, bien égoutté, est alors repris par de l'eau distillée; l'albumine entre en solution et la myoprotéine se sépare sous l'aspect de gros flocons grisâtres s'agglomérant en une masse visqueuse et exsudant un liquide clair (synérèse).

On procède dans les mêmes conditions à une série de précipitations acétoniques pour éliminer la totalité de la myxoprotéine et purifier en même temps la sérum albumine.

Quatre à cinq précipitations sont en général nécessaires, faites à 0° et en évitant, tout réchauffement pendant la centrifugation.

Telle qu'elle est la méthode à l'acétone permet une séparation très satisfaisante des protéines tout au moins pour les sérums normaux.

Cependant comme toute méthode elle demande des perfectionnements et notamment il restait certains points à étudier de plus près, à la fois au point de vue de son application pratique et au point de vue théorique, surtout en ce qui concerne la myxoprotéine : ce sont ces points que M. Piettre nous a demandé d'étudier.

On comprendra aisément que ce soit là une tâche importante, si l'on songe combien les protéines de sérums sont voisines par leurs propriétés physiques et surtout en raison de leur grande inertie chimique et même physique (fait que M. Piettre a eu le grand mérite d'introduire dans la science), qui les rend inactives vis-à-vis des réactifs minéraux ou organiques.

Deux motifs surtout rendent nécessaire un supplément de recherches :

1° C'est d'abord parce que les quantités de myxoprotéine dans les sérums normaux étant vraiment très faibles (0,5 à 0,9 %), les conditions de sa préparation méritent d'être précisées avec le plus grand soin possible.

2° C'est ensuite parce que dans les sérums pathologiques (et les nombreux exemples cités dans les travaux de M. Piettre et dans la thèse d'Arcand le mettent bien en

lumière) de même que dans les immusérums qui, en réalité sont également des sérums pathologiques, il est bien rare que l'on obtienne une bonne séparation de la globuline d'avec la myxoprotéine. Il y a entraînement plus ou moins important, suivant les cas, pour des causes sans doute plutôt physiques que chimiques qu'il reste à déterminer. Dans tout ces cas donc, si l'on peut obtenir à l'état pur une grande partie de la sérum globuline, il en reste en général une fraction restée dispersée, qui ne se séparera qu'avec la myxoprotéine dès lors souillée plus ou moins de globuline. On est averti d'ailleurs de cet entraînement réciproque par l'aspect blanc grenu que prend la myxoprotéine qui, à l'état pur, se présente en gros flocons grisâtres, collants, visqueux.

M. Piettre a indiqué un procédé de séparation qui n'est pas parfait ; il consiste à mettre le mélange globuline + myxoprotéine en suspension dans une solution de NaCl à 9 ‰ à rendre homogène par agitation, puis à centrifuger, à grande vitesse. La majeure partie de la globuline bien moins soluble dans NaCl est ainsi séparée, la liqueur restante centrifugée est séchée sur vide sulfurique. Puis on reprend par le même volume d'eau distillée, laisse en contact et centrifuge pour éliminer encore des traces de globuline. Finalement on obtient en solution une myxoprotéine relativement pure, dont on chasse le chlorure par dialyse.

Nos recherches expérimentales ont porté sur les divers points suivants :

- 1^o Conditions de la floculation de la sérum globuline.
- 2^o Conditions de la floculation de la myxoprotéine.
- 3^o Relations pour un sérum donné entre son extrait sec, sa teneur en protéines et l'alcalinité sous ses divers aspects : alcalinité de floculation, alcalinité totale des protéines.
- 4^o Enfin nous dirons quelques mots des émulsions en milieu acétonique aqueux déjà signalées par Piettre et par Arcand.

CHAPITRE II

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

I. — Conditions de floculation de la sérum-globuline.

Rappelons en quelques mots la technique de floculation de la sérum globuline telle qu'elle est indiquée dans la thèse d'Arcand :

Le gâteau sec des protéines totales une fois dispersé dans son volume d'eau (c'est-à-dire 20 cmc.) on complète avec de l'eau distillée pour faire un volume de 30 cmc.

Les essais de floculation sont alors pratiqués de la façon suivante : on répartit dans 6 tubes à hémolyse placés sur un portoir 0 cmc, 50 par tube de la solution de protéines puis on fait tomber dans le premier de l'acide $\text{HCl } \frac{\text{N}}{100}$, dixième par dixième, et en mélangeant doucement chaque fois jusqu'à apparition d'un trouble uniforme et persistant.

Ce trouble indique le début de la floculation de la globuline. Il suffit d'ajouter dans chacun des autres tubes la même quantité d'acide, augmentée chaque fois de $\frac{1}{10}$ d'acide en plus. On laisse déposer ou mieux pour aller plus vite en centrifugeant les tubes même avec leur contenu. Et il suffit alors, une fois les flocculats bien déposés, de chercher quel est le tube ne donnant aucune opalescence soit par addition d'acide $\text{HCl } \frac{\text{N}}{100}$ soit de base $\text{NaOH } \frac{\text{N}}{10}$.

M. Piettre a indiqué qu'il pourrait être très utile de faire

un 7^e tube destiné à serrer de plus près l'optimum de floculation en lui ajoutant un volume d'acide HCl $\frac{N}{100}$ intermédiaire entre les deux tubes ayant le mieux floculé.

Dans ce tube la floculation de la globuline peut être considérée *a priori* comme complète et le volume d'acide $\frac{N}{100}$ utilisé sera le volume cherché ; on calcule alors la quantité d'acide $\frac{N}{10}$ qui doit être ajoutée au volume restant de la solution protéinique totale. La globuline précipite. On rince les parois de l'éprouvette avec quelques centimètres cubes d'eau distillée de façon à faire un volume d'environ 50 cmc. et on laisse au repos à la température du laboratoire.

DISCUSSION DE LA TECHNIQUE.

L'étude des conditions de la précipitation de la sérum globuline dans les essais préliminaires montre que, le facteur *acide* étant mis à part, il faut examiner le facteur *dilution*.

Or d'une façon générale il se trouve que la meilleure dilution correspond à une dilution double en eau, c'est-à-dire que partant de 0 cmc, 5 de solution de protéine au volume du sérum initial, la précipitation la plus complète de la sérum globuline sera obtenue quand on aura un volume de 1 cmc,5 environ. C'est donc ces *conditions de dilution qu'il faut théoriquement réaliser dans la liqueur qu'il reste à flocler*.

La dilution de 20 à 30 indiquée par Arcand ne paraît donc pas *a priori* suffisante. Sans doute, il y a un inconvénient à diluer très fortement car cela entraîne dans les opérations ultérieures (précipitation de la myxoprotéine et purification de la sérum albumine) de très grands volumes d'acétone, aussi Piettre avait-il indiqué provisoirement

pour compenser dans une certaine mesure une trop grande dilution, de saturer d'éther au préalable la liqueur protéinique avant floculation définitive par les acides.

Nous avons cherché à étudier l'action seule de l'eau distillée sur la liqueur protéinique totale amenée au volume primitif du sérum, pour préciser à quelle dilution correspond le maximum de poids de sérum globuline.

Ce qui rend délicat ce problème de la floculation de la sérum globuline c'est qu'il embrasse deux phénomènes bien différents : d'une part une *réaction chimique* et d'autre part un *phénomène physique*.

La *réaction chimique* est essentiellement la *neutralisation* par HCl des carbonates alcalins du sérum entraînés par les protéines et plus spécialement par la sérum globuline pendant la précipitation acétonique. Or on le sait, cette neutralisation est incomplète dans les conditions de l'expérience : il se fait un équilibre entre HCl, CO² et l'alcali. On pourrait, il est vrai, éliminer par le vide la majeure partie de CO² libéré par HCl mais ce serait une difficulté considérable à surmonter pratiquement sauf pour des recherches très spéciales.

Le *phénomène physique de floculation* bien qu'étudié de très près pour les colloïdes minéraux ne l'a pas été encore pour les colloïdes biologiques. Il est d'autant plus difficile à aborder que l'on connaît bien peu les protéines et que la floculation se produit dans un milieu complexe, sels minéraux, HCl, CO² et en présence de substances protéiniques ayant des propriétés physiques différentes.

Il est donc prudent de se contenter de préciser les conditions expérimentales correspondant à la séparation totale de la sérum globuline.

Le fait le plus évident est que si la liqueur que l'on vient de floculer par HCl $\frac{N}{10}$ n'est pas diluée au degré voulu il reste encore dispersées de petites quantités de sérum globuline.

Prélevons en effet dans cette liqueur insuffisamment diluée une petite quantité de liquide rendu clair par centrifugation et ajoutons une faible quantité d'eau, nous constatons *qu'il se fait un très léger trouble*, blanc, grenu, possédant tous les caractères de la sérum globuline.

Cette constatation nous montre donc *que la floculation de la sérum globuline n'est pas complète*. A quoi peut-on attribuer cette floculation incomplète ? A une question d'équilibre entre HCl et CO² pour une concentration trop grande de la liqueur ou bien à une viscosité encore trop forte du milieu.

Cette dernière explication nous paraît la plus vraisemblable puisque, par simple dilution, des traces de sérum-globuline restées en dispersion s'agglomèrent et floculent.

Les expériences suivantes sont consacrées à cette démonstration.

INFLUENCE DE LA DILUTION SUR LA FLOCCULATION DE LA SÉRUM-GLOBULINE.

Voici les directives expérimentales suivies :

1° On prélève 3 cmc. de la solution protéinique totale obtenue par précipitation acétonique des protéines d'un sérum de bœuf par exemple. On les répartit dans 6 tubes à hémolyse et on détermine par la méthode décrite plus haut l'optimum rectifié de floculation pour 0 cmc,5 de la sérum-globuline. On calcule alors le volume d'HCl $\frac{N}{10}$ qu'il faut ajouter à 20 cmc. de liqueur protéinique totale correspondante. Soit v ce volume.

2° D'autre part on répartit dans 5 éprouvettes graduées, un égal volume soit 20 cmc. de solution protéinique totale par éprouvette. On verse alors dans chaque éprouvette le volume v de HCl $\frac{N}{10}$ calculé précédemment. On laisse dé-

poser la globuline floculée. On ajoute ensuite aux quatre dernières éprouvettes respectivement 30, 40, 50, 60 cmc. d'eau distillée. On agite doucement 2 ou 3 fois chaque éprouvette bien fermée par la paume de la main puis on laisse reposer 6 heures. On centrifuge, lave deux fois les culots avec de l'eau distillée, sèche au bain-marie puis à l'étuve à 105°-107°, et pèse.

EXPÉRIENCE I.

(Sérum de bœuf nivernais, 4 ans).

Volume du sérum mis en œuvre 150 cm³

Précipitation acétonique :

Acétone pour précipitation 375 cm³

2 lavages à l'acétone 300 cm³

4 lavages à l'éther 400 cm³

Protéines reprises par son volume d'eau, V = 150 cm³

Essais de floculation sur 3 cm³ répartis en 6 tubes à hémolyse. Optimum rectifié de floculation avec 1 cm³, 15 HCl $\frac{N}{100}$ soit pour 1 cm³ :

2 cm³, 3 HCl $\frac{N}{100}$.

20 cm³ = 20 × 2,3 = 46 cm³ HCl $\frac{N}{100}$ ou 4 cm³, 6 HCl $\frac{N}{10}$.

Addition à chaque éprouvette 4 cm³ 6 HCl $\frac{N}{10}$ puis aux quatre dernières respectivement 30, 40, 50, 60 cm³ d'eau distillée.

Repos 6 heures après centrifugation et lavages, les culots sont séchés et pesés.

Eprouvettes	Poids de globuline correspondants
N° 1.....	0,3068
N° 2.....	0,3214
N° 3.....	0,3508
N° 4.....	0,3427
N° 5.....	0,3424

EXPÉRIENCE II.

(Sérum de génisse.)

Volume de sérum mis en œuvre 150 cm³

Précipitation acétonique :

Acétone pour précipitation 375 cm³

3 lavages à l'acétone 325 cm³

4 lavages à l'éther 400 cm³

Protéines reprises par son volume d'eau distillée 100 cm³

Essai de floculation sur 3 cm³ répartis en 6 tubes à hémolyse. Optimum rectifié de floculation avec 0 cm³ 9 HCl $\frac{N}{100}$ soit pour

$$1 \text{ cm}^3 : 1 \text{ cm}^3 8 \text{ HCl } \frac{N}{100}$$

$$20 \text{ cm}^3 : 1 \text{ cm}^3 8 \times 20 = 36 \text{ cm}^3 \text{ HCl } \frac{N}{100} \text{ ou } 3 \text{ cm}^3 6 \text{ HCl } \frac{N}{10}$$

addition de 3 cm³ 6 HCl $\frac{N}{10}$ à chaque éprouvette, dilution des 4 dernières comme dans l'expérience précédente. Après centrifugation, les culots sont lavés et séchés et pesés :

Eprouvettes	Poids correspondant de globuline
N° 1.....	0 gr. 2819
N° 2.....	0 gr. 2942
N° 3.....	0 gr. 3106
N° 4.....	0 gr. 3078
N° 5.....	0 gr. 3062

EXPÉRIENCE III.

(Sérum de bœuf nivernais 5 ans 1/2).

Volume de sérum mis en œuvre 150 cm³

Précipitation acétonique :

Volume d'acétone pour précipitation 375 cm³

3 lavages à l'acétone 340 cm³

3 lavages à l'éther 300 cm³

Protéines dissoutes dans son volume d'eau.. 150 cm³

Essai de floculation sur 3 cm³ répartis en 6 tubes à hémolyse. Optimum rectifié de floculation avec 1 cm³ 25 HCl $\frac{N}{100}$ soit

pour 1 cm³ : 2 cm³ 50 HCl $\frac{N}{100}$

20 cm³ : $2,5 \times 20 = 50$ cm³ HCl $\frac{N}{100}$ ou 5 cm³ HCl $\frac{N}{10}$

addition à chaque éprouvette de 5 cm³ HCl $\frac{N}{10}$. On achève comme précédemment.

Eprouvettes	Poids correspondant de globuline
N ^o 1	0 gr. 3245
N ^o 2	0 gr. 3584
N ^o 3	0 gr. 3714
N ^o 4	0 gr. 3708
N ^o 5	0 gr. 3708

EXPÉRIENCE IV.

(Sérum de cheval.)

Volume de sérum mis en œuvre 150 cm³

Précipitation acétonique :

Acétone pour précipitation	375 cm ³
3 lavages à l'acétone	300 cm ³
3 lavages à l'éther	300 cm ³
Protéines dissoutes dans son volume d'eau	150 cm ³

Essai de floculation sur 3 cm³ répartis en 6 tubes à hémolyse. Optimum rectifié de floculation avec 1 cm³, 4 HCl $\frac{N}{100}$ soit

pour 1 cm³ : 2 cm³ 8 HCl $\frac{N}{100}$

20 cm³ : $2 \text{ cm}^3 8 \times 20 = 56$ cm³ HCl $\frac{N}{100}$

ou 5 cm³, 6 HCl $\frac{N}{10}$.

addition à chaque éprouvette 5 cm³, 6 HCl $\frac{N}{10}$. On termine comme précédemment.

Eprouvettes	Poids correspondant de globuline
N ^o 1.....	0 gr. 2835
N ^o 2.....	0 gr. 3146
N ^o 3.....	0 gr. 3712
N ^o 4.....	0 gr. 3642
N ^o 5.....	0 gr. 3619

EXPÉRIENCE V.

(Sérum de vache.)

Volume de sérum mis en œuvre 150 cm³

Précipitation acétonique :

Acétone pour précipiter 375 cm³
 3 lavages à l'acétone..... 325 cm³
 2 lavages à l'éther 250 cm³
 Protéines dissoutes dans son volume d'eau 150 cm³

Essai de floculation sur 3 cm³ répartis en 6 tubes à hémolyse. Opti-
 mum rectifié de floculation avec 1 cm³ 45, HCl $\frac{N}{100}$ soit

pour 1 cm³ : 2 cm³, 90 HCl $\frac{N}{100}$

20 cm³ : 2,90 × 20 = 58 cm³ HCl $\frac{N}{100}$ ou 5 cm³, 8 HCl ou $\frac{N}{10}$

addition à chaque éprouvette de 5 cm³, 8 HCl $\frac{N}{10}$

On continue comme précédemment.

Eprouvettes	Poids de globuline correspondant
N ^o 1.....	0 gr. 2914
N ^o 2.....	0 gr. 3258
N ^o 3.....	0 gr. 3542
N ^o 4.....	0 gr. 3371
N ^o 5.....	0 gr. 3329

L'examen de ces tableaux nous montre :

1^o Que le poids de globuline de l'éprouvette n^o 3 est
toujours légèrement supérieur à celui des autres éprou-
 vettes. Il en résulte que la floculation *maxima* de cette pro-

téine a lieu lorsqu'on a réalisé une *dilution totale triple*, c'est-à-dire lorsque 1 volume de liqueur protéinique initiale a été porté à 3.

Or il se trouve que cette dilution correspond aussi exactement que possible à la dilution obtenue dans les essais préliminaires pour une floculation maxima.

2^o Qu'au delà de cette dilution maxima, de petites quantités de sérum-globuline se dispersent dans un volume d'eau trop considérable ; c'est ce qui explique, semble-t-il, la diminution de poids dans les 2 dernières éprouvettes 4 et 5.

M. Piettre a montré, en effet, que la globuline après des lavages trop nombreux éliminant toute trace d'électrolytes (ici d'HCl), se gonfle dans l'eau et commence à se disperser. Pendant les premiers lavages les flocons sont grenus, serrés, puis dès que le pH se rapproche de celui de l'eau distillée, ces flocons deviennent plus lâches et les eaux de lavage paraissent opalescentes. Il y a donc ici une question de pH qu'il serait intéressant d'étudier de plus près.

3^o La conclusion pratique de ces recherches est donc *que pour obtenir une précipitation totale de la sérum-globuline, il importe de réaliser une dilution de la liqueur protéinique égale à 3 fois son volume primitif.*

II. — Conditions de floculation de la myxoprotéine.

INFLUENCE DE LA DILUTION SUR LA PRÉCIPITATION DE LA MYXOPROTÉINE.

Cette étude est le complément ou plus exactement la contre-épreuve de la précédente.

En effet, si la quantité de sérum-globuline floculée par

addition progressive d'eau est différente suivant les dilutions, ces variations doivent se traduire lorsqu'on traitera les liqueurs diluées (débarrassées de globuline) par de l'acétone pour précipiter la myxoprotéine, par des rendements inverses en myxoprotéine.

Si cela est vrai on doit constater que pour les premières dilutions, tout au moins les rendements en myxoprotéine devront aller en diminuant jusqu'au moment où cette protéine ne sera plus souillée de globuline qui aura été antérieurement floculée d'une façon complète.

On part donc des liqueurs précédentes débarrassées par centrifugation de la sérum-globuline floculée. Ces liqueurs bien claires, sur un égal volume chaque fois 20 cmc, sont précipitées par leur volume d'acétone à 0°.

Les précipités acétoniques bien égouttés renferment la sérum-albumine et la myxoprotéine. Ils sont redissous aussitôt à froid dans un même volume d'eau (le même que celui dont on est parti).

La sérum-albumine comme on le sait, se dissout très rapidement, laissant floculée la myxoprotéine sous forme de gros flocons grisâtres s'agglomérant et tombant rapidement en une masse visqueuse. Au contraire quand la myxo est souillée de sérum-globuline, le floculat est blanc, d'aspect plus grenu, à grains très fins et reste plus longtemps en suspension.

Par centrifugation on sépare avec soin l'insoluble, le lave à l'eau, le sèche et le pèse.

Les tableaux suivants représentent les résultats obtenus en partant des liqueurs surnageantes des cinq expériences précédentes.

EXPÉRIENCE I bis.

(Sérum de bœuf nivernais, 4 ans.)

Les volumes respectifs des liqueurs surnageantes dans les éprouvettes après addition de la première eau de lavage des culots de globu-

line et en tenant compte des volumes d'HCl $\frac{N}{100}$ ajoutés à chaque éprouvette pour amener la floculation de la globuline dans les expériences précédentes, sont les suivants : 30 cm³, 60 cm³, 70 cm³, 80 cm³, 90 cm³.

Epruvette	Volume de liqueur débarassée de globuline	Volume d'acétone froide pour précipiter	Volume d'eau pour reprendre le précipité	Dépôt de myxoprotéine		
				Aspect	Durée du dépôt	Poids du sec.
N° 1	30 cm ³	30 cm ³	30 cm ³	Blanc grenu	2 heures	0 gr. 1718
N° 2	60 —	60 —	60 —	Blanc grenu	1 heure	0 gr. 1058
N° 3	70 —	70 —	70 —	Grisâtre, visqueux	Instantané	0 gr. 0362
N° 4	80 —	80 —	80 —	—	3/4 h.	0 gr. 0435
N° 5	90 —	90 —	90 —	—	1 heure	0 gr. 0585

EXPÉRIENCE II *bis*.

(Sérum de génisse.)

Epruvette	Volume de liqueur surnageante	Volume d'acétone pour précipiter	Volume d'eau pour dissoudre	Dépôt de myxoprotéine		
				Aspect	Durée	Poids du sec.
N° 1	29 cm ³	29 cm ³	29 cm ³	Blanc grenu	2 heures	0 gr. 193
N° 2	59 —	59 —	59 —	—	40 minutes	0 gr. 178
N° 3	69 —	69 —	69 —	Grisâtre caractérist. visq adhérent aux parois de l'éprouvette.	Instantané	0 gr. 086
N° 4	79 —	79 —	79 —	—	1/2 heure	0 gr. 162
N° 5	89 —	89 —	89 —	—	3/4 heure	0 gr. 1042

EXPÉRIENCE III *bis*.

(Sérum de bœuf nivernais, 5 ans 1/2.)

Eprouvette	Volume de liqueur surnageante	Volume d'acétone pour précipiter	Volume d'eau pour reprendre le précipité	Dépôt de myxoprotéine		
				Aspect	Durée	Poids du sec.
N ^o 1	30 cm ³	30 cm ³	30 cm ³	Blanc grenu	2 h. 1/2	0 gr. 127
N ^o 2	60 —	60 —	60 —	—	1 h. 1/4	0 gr. 098
N ^o 3	70 —	70 —	70 —	Grisâtre, visqueux, adhérent aux parois	Instantané	0 gr. 042
N ^o 4	80 —	80 —	80 —	—	3/4 heure	0 gr. 087
N ^o 5	90 —	90 —	90 —	—	3/4 heure	0 gr. 079

EXPÉRIENCE IV *bis*.

(Sérum de cheval.)

Eprouvette	Volume de liqueur surnageante	Volume d'acétone pour précipiter	Volume d'eau pour reprendre le précipité	Dépôt de myxoprotéine		
				Aspect	Durée	Poids du sec
N ^o 1	31 cm ³	31 cm ³	31 cm ³	Blanc grenu	3 heures	0 gr. 1483
N ^o 2	91 —	61 —	61 —	—	3/4 heure	0 gr. 1045
N ^o 3	71 —	71 —	71 —	Grisâtre, visqueux, caractérist.	Instantané	0 gr. 0847
N ^o 4	81 —	81 —	81 —	—	1/2 heure	0 gr. 0885
N ^o 5	91 —	91 —	91 —	—	3/4 heure	0 gr. 0917

EXPÉRIENCE V *bis*.

(Sérum de vache.)

Eprouvette	Volume de liqueur surnageante	Volume d'acétone pour précipité	Volume d'eau pour reprendre le précipité	Dépôt des myxoprotéines		
				Aspect	Durée	Poids du sec
N° 1	31 cm ³	31 cm ³	31 cm ³	Blanc grenu	4 heures	0 gr. 2101
N° 2	61 —	61 —	61 —	—	2 h. 1/2	0 gr. 2147
N° 3	71 —	71 —	71 —	Grisâtre, vis- queux caractéristique.	Instantané	0 gr. 1784
N° 4	81 —	81 —	81 —	—	1 heure	0 gr. 1923
N° 5	91 —	91 —	91 —	—	1 heure	0 gr. 1978

La comparaison des résultats de ces 2 séries d'expériences confirme nettement les prévisions théoriques.

On voit notamment :

1^o Que les poids de floculats obtenus vont en décroissant jusqu'à la troisième dilution.

2^o Que de petites quantités de globuline souillent les deux premiers dépôts et se reconnaissent aux caractères physiques imprimés aux floculats blancs, grenus.

3^o Enfin que lorsque la sérum-globuline a été précipitée complètement on obtient la myxoprotéine pure grisâtre, visqueuse, adhérente. *Au maximum de précipitation de la globuline correspond donc en quelque sorte le minimum de myxoprotéine libre de toute globuline.*

En ce qui concerne les deux dernières dilutions (4^e et 5^e éprouvettes) il reste à expliquer l'augmentation non négligeable de la myxoprotéine indiquée par les chiffres. Il ne peut être question de la sérum-globuline si l'on a bien opéré à 0^o pour éviter toute condensation de cette protéine mais il s'agit bien de myxoprotéine par tous les caractères que nous signalerons plus loin.

La seule conclusion logique est donc qu'une floculation complète de cette protéine est fonction de la dilution, comme il vient d'être démontré plus haut pour la sérum globuline.

Dans la pratique pour obtenir une plus grande précipitation de la myxoprotéine de premier jet il faudra donc pousser plus loin les dilutions aqueuses que ne l'indique Arcand ; c'est-à-dire aller aux environs du volume double de la liqueur à traiter.

Cette notion nouvelle est intéressante dans ces limites mais les dépasser, c'est se condamner à des dépenses considérables d'acétone pour les opérations ultérieures. En effet en dehors de l'influence stabilisante des électrolytes et en particulier ici de NaCl, la sérum-albumine a une action d'entraînement certaine vis-à-vis de la myxoprotéine. D'une part cette dernière protéine isolée exige de nombreux lavages à l'eau distillée suivis de centrifugation pour être débarrassée de toute trace de sérum-albumine comme Piettre l'a constaté à maintes reprises. D'autre part il faut au minimum 4 à 5 précipitations acétoniques pour séparer complètement d'une liqueur mère, les 2 protéines, ces précipitations devant être faites à basses températures avec un volume au plus égal d'acétone pour éviter toute trace de condensation de l'albumine. Avec des dilutions trop poussées on ne floculerait pas, quand même toute la myxoprotéine et les petites quantités entraînées par les électrolytes et surtout par la sérum-albumine seraient extrêmement pénibles à séparer et exigeraient de grands volumes d'acétone.

CONCLUSION.

La conclusion pratique de ces expériences indique que la sérum-globuline une fois complètement séparée, il conviendrait de *reprendre le floculat acétonique par un volume*

d'eau sensiblement double de celui du sérum mis en œuvre sans oublier l'inconvénient des grands volumes d'acétone pour la purification ultérieure de la sérum-albumine.

III. — Relations.

- a) Entre la teneur en protéines sériques et l'alcalinité entraînée par ces substances après précipitation acétonique et l'alcalinité totale du sérum.
- b) Entre les extraits secs, la teneur en protéines et l'alcalinité des sérums normaux et pathologiques.

Dans ses très nombreuses recherches M. Piettre avait constaté très nettement les deux faits suivants :

1^o Il existe une relation évidente entre la teneur en protéines (et également en extrait total) d'un sérum et l'acidité de floculation de la globuline c'est-à-dire qu'avec des sérums riches il faut plus d'acide pour flocculer la globuline qu'avec des sérums pauvres.

2^o L'alcalinité retenue par les protéines pendant la floculation acétonique varie notablement suivant les sérums et parfois très légèrement avec le même sérum dans deux traitements successifs.

Ces deux faits expliquent que chaque expérience de traitement acétonique exige malheureusement, sur des essais préliminaires, la détermination de l'optimum de floculation de la globuline par les acides.

La thèse d'Arcand contient de nombreux exemples illustrant le premier point ; exemples :

a) Sérums riches en extrait sec :

	Matières sèches %	Acidité de floculation %
		—
N ^o 9 (Sérum d'Hypertendu)	10,256	18 cm ³ HCl $\frac{N}{10}$
N ^o 15 — — — — —	9,635	16 —
N ^o 16 (Sérum myxœdémateux) . . .	10,170	16 —
N ^o 17 (Sérum cardiaque)	9,46	18 —
N ^o 21 (Sérum chez aortique)	10,335	17 —

b) *Sérums pauvres en extrait sec :*

	Matières sèches %	Acidité de floculation %
N° 30 (Sérum de néphrite)	8,11	14 cm ³ HCl $\frac{N}{10}$
N° 38 (Sérum de pneumonique)	7,80	14 —
N° 51 — — — — —	8,315	12 —

Le deuxième point mérite d'être étudié et nous avons fait quelques recherches sur des sérums normaux de différents animaux, et sur des sérums d'une même espèce soumise à des saignées répétées. Nous sommes heureux de remercier ici MM. les Drs G. Roussel et Brocq Rousseux qui ont bien voulu adresser à M. Pieltre, pour nous-même, un certain nombre de ces sérums.

Laissant de côté la question si spéciale et qui reste entière pour les physico-chimistes de l'entraînement des sels du sérum (carbonates, chlorures, etc...) nous examinerons le seul côté analytique du problème.

TECHNIQUE DES EXPÉRIENCES.

Elle comprend les trois points suivants :

- 1° Préparation de la solution aqueuse des protéines totales.
- 2° Dosage des alcalis retenus par ces protéines.
- 3° Enfin titrage de l'alcalinité totale du sérum à étudier.

La préparation de la solution aqueuse des protéines s'effectue par la technique habituelle à l'aide d'acétone à 0° (2 volumes et demi) suivie de 3 lavages à l'acétone et à l'éther. Les protéines sèches sont reprises exactement par le volume d'eau primitif.

La solution ainsi préparée est utilisée :

D'une part pour déterminer la quantité de protéines rapportées à 100 cmc. de sérum, d'autre part pour obtenir la teneur en alcali correspondante.

L'extrait sec est fait sur 10 cmc. qu'on sèche en capsule de platine au bain-marie bouillant puis à 105-107° à l'étuve jusqu'à poids constant. On calcine ensuite au rouge

sombre, de façon à brûler le charbon sans fusion des cendres.

On dissout alors les cendres dans 20 cmc. d'eau distillée, rince soigneusement la capsule avec 20 cmc. d'eau en 3 fois. On verse le tout dans une fiole, y ajoute 4 à 5 gouttes de rouge de méthyle et titre comme d'habitude à l'acide $\frac{N}{10}$ jusqu'à virage au rouge persistant à l'ébullition.

Enfin l'alcalinité totale est déterminée sur le sec du sérum primitif : 10 cmc. de sérum séché en capsule de platine au bain-marie bouillant puis à l'étuve à 105-107° est calciné comme plus haut. On titre de même par la même méthode l'alcalinité des cendres obtenues.

Voici les résultats obtenus :

I. — SÉRUMS NORMAUX (*espèces animales différentes*)

Pour 100 cm³ de sérum étudié.

	Sérums		Protéines		Alcalinité correspondant à la floculation de la globuline en $\frac{NaOH}{10}$
	Extrait sec total	Alcalinité en $\frac{NaOH}{10}$	Extrait sec de protéines totales	Alcalinité en $\frac{NaOH}{10}$	
	gr.	cm ³	gr.	cm ³	mc ³
Bœuf	9,13	41	7,95	21	32
	9,63	43	8,07	30	30
	8,80	40	7,52	25,6	28
Cheval ..	8,216	36,2	6,89	10,8	15
Homme ..	9,432	28	79,104	12	17
	8,836	26	6,924	15	15
	8,852	28	6,920	16	22
Mouton ..	7,91	33,7	6,84	17,1	25
	7,93	30	6,17	27,5	30
	8,03	32,	7	20	28
	8,13	20	6,30	18	17
	8,92	26	6,47	12	18
	8,23	22	6,62	16,5	18

II. — SÉRUMS DE CHEVAUX AYANT SUBI DES SAIGNÉES RÉPÉTÉES.

(Pour 100 cm³ de sérum employé.)

	Sérums		Protéines		Poids de globuline
	Extrait sec total	Alcalinité totale en	Extrait séc des protéines totales	Alcalinité proténique en	
		NaOH $\frac{N}{10}$		NaOH $\frac{N}{10}$	
	gr.	cm ³	gr.	cm ³	gr.
Cheval à la 3 ^e saignée	6,916	24	5,276	10	0,1708
— 7 ^e —	6,916	18	5,016	11	0,1908
— 10 ^e —	6,636	26	5,216	12	0,1385
— 21 ^e —	6,836	24	5,816	18	0,1749
— 30 ^e —	6,816	20	5,236	12	0,2103
— 40 ^e —	7,117	27	5,770	16	0,1760

Dans cette dernière série d'expériences nous avons poussé plus loin les investigations en dosant la *sérum-globuline*. Il serait intéressant en effet, de rapprocher pondéralement globuline et alcali et d'établir, par de très nombreuses expériences, s'il est possible d'en dégager une relation étroite, peut-être une constante. Une telle donnée éclairerait d'une façon intéressante la délicate question de l'entraînement physique par la globuline des sels en particulier des carbonates alcalins.

Il semble bien en effet, étant donné les propriétés de la myxoprotéine et surtout de l'albumine que l'entraînement minéral par les protéines, au cours de la précipitation acétonique, soit avant tout le fait de la *sérum-globuline*. Malheureusement le dosage de la *sérum-globuline* avec de tels sérums, qui se conduisent comme des *sérums pathologiques*, est très difficile quelques précautions que l'on prenne, telle celles que nous avons indiquées précédemment en ce qui concerne la dilution. De petites quantités sans doute, mais non négligeables de globuline restent dispersées et se

retrouvent mélangées à la myxoprotéine dont la séparation est pratiquement incomplète.

L'étude de ces chiffres, comme on le voit, n'autorise pas à des conclusions de quelque valeur. Ils ne portent pas en effet, sur un nombre suffisant de sérums et les sérums eux-mêmes ne sont pas comparables d'une espèce à une autre.

Avant de terminer cette étude sur l'alcalinité sérique, il nous a paru intéressant de dire quelques mots sur l'*acidité de floculation* de la globuline que M. Piettre définit par le volume d' $\text{HCl } \frac{N}{100}$, rapporté à 1 cmc. de sérum, qui provoque la floculation optima de la globuline.

Il semblerait *a priori* qu'on pourrait la calculer d'après l'alcalinité totale des cendres de l'extrait sec des protéines totales, comme l'a indiqué M. Vila. Or les expériences précédentes montrent qu'une telle relation est loin d'être exacte ; en particulier les chiffres du tableau 1 (sérums normaux) donnent toujours des acidités de floculation supérieures à celles résultant de la mesure de l'alcalinité des cendres faite sur les protéines totales.

Nous avons déjà indiqué les raisons chimiques et physico-chimiques de cette différence.

D'une façon générale l'acidité de floculation oscille entre 2 cm³ 2 et 2 cm³ 4 comme il ressort des expériences précédentes et des recherches antérieures de M. Piettre sur cette question.

Elle descend rarement au-dessous de 1 cm³ 8 dans les sérums pauvres mais peut atteindre 2 cm³ 8 chez les sujets pléthoriques et dans certains immusérums. Piettre signale en effet que dans l'immunisation contre le venin de serpent (surtout crotale) la concentration sérique s'élève fortement avec des extraits secs totaux de 99 et même 105 %. L'acidité de floculation tout en augmentant ne suit cependant pas un accroissement proportionnel.

IV. — Étude expérimentale des émulsions.

ACÉTONIQUES AQUEUX.

Tout comme Arcand nous nous sommes trouvé fréquemment aux prises avec des émulsions tenaces au cours des précipitations acétoniques successives destinées à séparer les dernières portions de myxoprotéine d'avec la sérum-albumine.

Constatant que ces émulsions se produisent surtout à mesure que l'on progresse dans la purification de la sérum-albumine et par suite dans la *déminéralisation du milieu*, M. Piettre a conclu qu'elles étaient favorisées par l'élimination des substances minérales.

Cette hypothèse s'est trouvée en particulier confirmée par le fait que l'addition d'électrolytes est un des moyens les plus sûrs de rompre ces émulsions.

Il faut ajouter cependant que des non-électrolytes, éther, acétone, alcool, aboutissent en général au même résultat surtout si on fait intervenir des facteurs physiques comme le froid de préférence. Cependant il est des émulsions qui cèdent difficilement même à une très grande addition d'acétone.

Nous avons repris ces recherches en essayant de pousser plus loin cette étude à l'aide de la technique physico-chimique. Aussi les avons-nous surtout examinées au laboratoire de M. Boutaric à la Faculté des Sciences de Dijon.

Nous citons plus spécialement quelques exemples typiques en les rangeant en deux catégories :

- a) Emulsions qui apparaissent au cours de purification acétonique de la sérum-albumine :
- b) Emulsions qui se forment dans des solutions protéiniques soigneusement *dialysées*, avant ou après élimination de la globuline.

A. — *Emulsions au cours de la précipitation acétonique de la sérum-albumine.*

Elles peuvent être totales ou partielles :

Totales, lorsqu'elles ne donnent aucun dépôt après centrifugation ;

Partielles, lorsqu'on obtient par centrifugation un culot plus ou moins important de protéines flocculées.

Emulsion totale au cours de la 3^e précipitation acétonique d'une sérum-albumine de bœuf.

Volume de l'émulsion	50 cm ³
Extrait sec sur 5 cm ³	0 gr. 0794
Soit % : $0,0794 \times 20 =$	1,588 %

Action des électrolytes : On répartit 2 cmc d'émulsion dans 5 tubes à hémolyse puis on ajoute successivement des volumes différents de solutions de divers électrolytes.

1° NaCl $\frac{N}{100}$.					
Tubes	I	II	III	IV	V
Emulsion ...	2 cm ³	2	2	2	2
NaCl $\frac{N}{100}$	0 cm ³ 2	0,5	0,7	0,9	1
Eau	0 cm ³ 8	0,5	0,3	0,1	0
	0	0	floculé	floculé	floculé

2° KCl $\frac{N}{100}$.					
Tubes	I	II	III	IV	V
Emulsion ...	2 cm ³	2	2	2	2
KCl $\frac{N}{100}$	0 cm ³ 2	0,5	0,7	1,9	1
Eau	0 cm ³ 8	0,5	0,3	0,1	1
			début de fl.	floculat.	floculat.

3° HCl $\frac{N}{100}$.

Tubes	I	II	III	IV	V
Emulsion	2 cm ³	2	2	2	2
HCl $\frac{N}{100}$	0 cm ³ 1	0,2	0,3	0,4	0,5
Eau	0 cm ³ 9	0,8	0,7	0,6	0,5
	flocul.	peptisat.	peptisat.	peptisat.	peptisat.

Non-électrolytes : acétone.

Tubes	I	II	III	IV	V	VI	VII
Emulsion	2 cm ³	2	2	2	2	2	2
Acét. pure	0 cm ³ 2	0,5	0,7	0,9	1	1,5	2
Eau	1 cm ³ 8	1,5	1,3	1,1	1	0,5	0
	0	0	0	0	début de floculation	floculé	floculé

Emulsion partielle au cours de la 4^e précipitation acétonique d'une sérum-albumine (cheval).

Volume d'émulsion : 100 cmc.

Après centrifugation 20' vitesse 6.000 tours on obtient :

a) un culot : poids 0gr. 8.427 de matière sèche.

b) émulsion : détermination de l'extrait sec sur 5 cmc.

0 gr. 0.452.

Soit pour 100 cmc. : $0,0452 \times 20 = 0 \text{ gr. } 9.040 \%$.

Action des électrolytes.

1° NaCl $\frac{N}{100}$.

Tubes	I	II	III	IV	V	VI
Emulsion	2 cm ³	2	2	2	2	2
NaCl $\frac{N}{100}$	0 cm ³ 2	0,5	0,7	0,9	1	1,2
Eau	1 cm ³ 8	1,5	1,3	1,1	1	0,8
	0	0	0	0	floc.	floc.

2° HCl $\frac{N}{100}$.

Tubes ...	I	II	III	IV	V	VI
	—	—	—	—	—	—
Emulsion	2 cm ³	2	2	2	2	2
HCl $\frac{N}{100}$	0 cm ³	1 0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Eau	1 cm ³	1,8	1,7	1,6	1,5	1,4

Non-électrolytes : *ether anhydre* (t = 0°).

Tubes ...	I	II	III	IV	V	VI
	—	—	—	—	—	—
Emulsion	2 cm ³	2	2	2	2	2
Ether.....	0 cm ³	5 0,8	0,9	1	1,5	2
Eau	1 cm ³	5 1,2	1,1	1	0,5	0
	0	0	0	0	0	floc.

B. — *Emulsions dans des solutions de protéines débarrassées de globuline puis dialysées.*

Si la formation des émulsions est assez fréquente dans les conditions des expériences précédentes, elle devient la règle avec les produits préalablement soumis à la dialyse et c'est là un appui à l'hypothèse de l'influence des électrolytes.

Emulsion après précipitation acétonique d'une liqueur protéinique débarrassée de globuline et dialysée 6 jours.

Volume de l'émulsion	125 cm ³
Extrait sec sur 10 cm ³	0 gr. 0819
Soit	0 gr. 819

Les essais de floculation par des électrolytes ont été effectués sur deux fractions de l'émulsion : l'une A telle quelle et l'autre B après *addition* de son volume d'eau distillée.

I. — EMULSION A.

On a réalisé les séries d'essais suivantes :

Tubes ...	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>
Emulsion .	4 cm ³	4	4	4	4	4
NaCl $\frac{N}{100}$..	0 cm ³ 3	0,5	0,8	1	1,5	2
Eau dist .	1 cm ³ 7 0	1,5 0	1,2 floculé	1 floc.	0,5 floc.	0 floc.

Tubes ...	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>
Emulsion .	4 cm ³	4	4	4	4	4
KCl $\frac{N}{100}$...	0 cm ³ 3	0,5	0,8	1	1,5	2
Eau	1,7 0	1,3 0	1,2 0	1 floc.	0,5 floc.	0 floc.

Tubes ...	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>
Emulsion .	4 cm ³	4	4	4	4	4
HCl $\frac{N}{500}$..	0 cm ³ 1	0,2	0,4	0,5	0,7	0,8
Eau	1 cm ³ 9 0	1,8 0	1,6 floc.	1,5 floc.	1,3 peptis.	1,2 pept.

Tubes ...	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>
Emulsion	4 cm ³	4	4	4	4	4
ThCl ⁴ $\frac{N}{5000}$	0 cm ³ 1	0,2	0,4	0,5	0,7	0,8
Eau	1 cm ³ 9 0	1,8 0	1,6 0	1,5 0	1,3 floc.	1,2 floc.

II. — EMULSION B. (Dilution d'un égal volume d'eau).

Tubes ...	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>
Emulsion .	4 cm ³	4	4	4	4	4
NaCl $\frac{N}{100}$.	0 cm ³ 3	0,5	0,8	1	1,5	2
Eau	1 cm ³ 7 0	1,5 0	1,2 0	1 0	0,5 floc.	0 floc.

Ho Dac

4

Tubes ...	I	II	III	IV	V	VI
Emulsion .	4 cm ³	4	4	4	4	4
KCl $\frac{N}{100}$...	0 cm ³ 9	1	1,5	2	2,5	3
Eau	1 cm ³	2	1,5	1	0,5	0
	0	0	0	0	0	floc.

Tubes ...	I	II	III	IV	V	VI
Emulsion .	4 cm ³	4	4	4	4	4
HCl $\frac{N}{500}$..	0 cm ³ 1	0,2	0,4	0,5	0,7	0,8
Eau	1 cm ³ 9	1,8	1,6	1,5	1,3	1,2
	0	0	0	0	floc.	floc.

Tubes ...	I	II	III	IV	V	VI
Emulsion .	4 cm ³	4	4	4	4	4
ThCl ⁴ $\frac{N}{5000}$.	0 cm ³ 1	0,2	0,4	0,7	0,8	0,9
Eau	1 cm ³ 9	1,8	1,6	1,3	1,2	1,1
	0	0	0	0	0	floc.

Nous pouvons tirer de ces expériences quelques notions intéressantes : en rappelant que les émulsions étudiées ont une relation évidente avec la présence de myxoprotéine :

1° En ce qui concerne le facteur électrolyte, son rôle se trouve nettement mis en lumière.

La déminéralisation trop poussée des protéines est une condition très favorable à la formation des émulsions.

L'addition d'électrolytes par contre tend à rompre les émulsions. Les électrolytes forts à cation polyvalents tels que ThCl⁴ et les ions H provoquent à très faibles doses une destruction rapide.

2° L'eau est un facteur important de stabilité des émulsions. L'augmentation des quantités d'électrolytes pour détruire l'émulsion marche de pair avec l'accroissement des volumes d'eau ajoutés à l'émulsion.

3° L'acétone, l'alcool, l'éther et de façon générale les déshydratants tendent au contraire à *diminuer la stabilité* des émulsions comme c'est la règle en physico-chimie.

S'agit-il du même mécanisme, transformation des colloïdes lyophiles en lyophobes par déshydratation ?

Cette interprétation pourrait être acceptée pour certains corps : dextrine, agar-agar, amidon, d'après les travaux de Kruyt (4).

Ce n'est pas démontré pour les corps qui nous occupent. Les protéines ont en effet des propriétés spéciales, très mal connues.

La floculation des diverses émulsions dans les mélanges myxoprotéine et sérum-albumine se réduit-elle seulement à une simple déshydratation, comme pour l'agar-agar, l'amidon et la dextrine ? Il semble qu'il s'y ajouterait un autre phénomène, une condensation plus ou moins accentuée sous l'influence de grandes quantités d'acétone même si l'on a soin d'opérer aux basses températures.

En fait on constate dans les cas de grandes additions de déshydratants (acétone, alcool) un début de dénaturation de l'albumine qui se traduit par une solubilité moindre dans l'eau.

Le passage à l'état colloïdal des protéines déminéralisées apparaît donc très complexe et demande de nombreuses et délicates recherches.

1. Kruyt (H. R.), *Revue générale des colloïdes*, n° 55, 1928, p. 118-133 et n° 56, 1928, p. 149-160.



DEUXIÈME PARTIE

Étude de la myxoprotéine

Cette deuxième partie, celle de beaucoup la plus importante de notre travail est consacrée à l'étude de la nouvelle substance que M. Piettre a isolée du sérum sanguin en 1932 à Rio de Janeiro et qu'il a appelée « myxoprotéine » (du grec $\mu\upsilon\chi\alpha$), mucilage pour rappeler son aspect visqueux très particulier.

Dans un premier chapitre nous exposerons les différentes méthodes de préparation ; puis dans une deuxième partie nous ferons l'étude des propriétés physiques et chimiques. Une troisième partie est spécialement consacrée aux propriétés physico-chimiques.

Enfin nous dirons quelques mots seulement sur ses propriétés physiologiques car elles exigeraient à elles seules de trop longues recherches.

CHAPITRE PREMIER

PRÉPARATION

On sait que lorsqu'on précipite la liqueur claire débarassée de globuline, par son volume d'acétone froide et qu'on redissout ensuite le précipité centrifugé et bien égoutté dans l'eau, la myxoprotéine extrêmement peu soluble dans ce solvant, se sépare sous forme de flocons grisâtres tombant rapidement en une masse visqueuse qui bientôt se rétracte comme un caillot exsudant, par « synérèse », un liquide en général extrêmement limpide.

D'autre part, si l'on soumet directement et par conséquent sans traitement acétonique, cette même liqueur privée de globuline à la dialyse ordinaire ou à l'électrodialyse on obtient, mais avec des proportions assez différentes, le même dépôt grisâtre au fond du dialyseur.

Deux méthodes permettent donc d'obtenir, avec des rendements variables d'ailleurs, la myxoprotéine : la *précipitation au moyen de l'acétone* et la *dialyse*.

Nous allons les exposer successivement en détail.

I. — Préparation par précipitation acétonique.

Nous employons pour cela la méthode à l'acétone en tenant compte de l'amélioration technique indiquée plus haut en ce qui concerne la dilution de la solution aqueuse des protéines qui doit être portée au triple de son volume au moment de la précipitation de la sérum-globuline.

Cette condition a en effet, nous l'avons démontré, le double avantage de conduire, à l'élimination totale de cette protéine et en même temps à l'isolement de la myxoprotéine à l'état de plus grande pureté tout au moins pour les sérums normaux.

Nous avons le plus souvent utilisé comme matière première le sérum de bœuf recueilli aux abattoirs de Vaugirard sur des animaux sains, bien reposés et en très bon état et cela pour trois raisons :

1^o Le sérum de bœuf et particulièrement de taureau (5 cas étudiés) contient une proportion convenable de myxoprotéine environ 7 à 10 gr. $\frac{0}{100}$ et cette teneur semble assez constante.

2^o En outre en raison des conditions du marché des sous-produits et tout spécialement du sang dans les abattoirs parisiens il est beaucoup plus facile de se procurer des quantités illimitées de sang de bœuf.

3^o Enfin, le nombre non négligeable des chevaux accidentés ou ayant fait l'objet de traitements spéciaux en vue des produits thérapeutiques expose, en s'adressant au cheval, de se trouver en présence de sérums plus ou moins anormaux.

Presque toutes les opérations ont porté sur 150 cm³ de sérum bien refroidi à 0^o puis centrifugé pour obtenir un liquide aussi clair que possible.

TECHNIQUE DE LA PRÉPARATION.

Voici la technique mise au point et dont nous avons cru utile de donner tous les détails.

1^o *Précipitation des protéines totales.* — Dans un grand bœcher de 1.000 cm³ plongé dans de la glace réduite en neige on verse 150 cm³ de sérum de bœuf. On laisse quel-

ques instants en agitant de temps à autre jusqu'à ce que la température de 0° soit atteinte.

On fait tomber au moyen d'une ampoule à robinet et en agitant vigoureusement 375 cm³ d'acétone purifiée passant à 57-58°, refroidie à 0°.

Sur un Büchner au fond duquel on applique avec le plus grand soin une feuille de papier filtre ordinaire, préalablement mouillée d'eau distillée, on verse d'abord la partie supérieure moins riche en précipité puis ensuite la masse du floculat et on essore au moyen d'une trompe à vide.

L'essorage peut être accéléré très sensiblement en libérant au fur et à mesure à l'aide d'une spatule métallique flexible le précipité qui tend à colmater le filtre. Ce précipité déposé sur la paroi du Büchner est, après écoulement de la presque totalité de la liqueur acétonique aqueuse, de nouveau bien réparti sur le filtre et égoutté à peu près complètement.

On lave à deux reprises, avec chaque fois 150 cm³ environ d'acétone froide, le gâteau des protéines qui sont malaxées, sur le filtre même et étalées avec la spatule, sur les parois du Büchner pour en faire une suspension bien homogène. On essore complètement chaque fois de la même manière. 3 ou 4 lavages à l'éther sec sont effectués pour éliminer le reste des lipides et surtout les stérols moins solubles dans l'acétone.

En prolongeant le vide après le dernier lavage à l'éther on a un gâteau de protéines séchées qui, broyé donne une belle poudre blanche.

On fait alors tomber cette poudre dans un grand cristalliseur de 300 cm³. Le filtre détaché est lui-même déposé sur un autre cristalliseur dans lequel on ajoute de petites quantités d'eau distillée pour dissoudre les traces de substance qui y sont restées attachées. On décante la solution et deux ou trois eaux de lavage dans le premier cristalliseur.

Le contenu de celui-ci est complété à 140 cm³ environ au moyen de l'eau distillée en ayant soin d'y ajouter 10 à 15 gouttes d'éther sec pour faciliter le mouillage des protéines.

On laisse reposer 24 heures en agitant de temps en temps et avec douceur. Les protéines une fois dispersées, sont centrifugées s'il est nécessaire pour avoir une liqueur d'une limpidité parfaite, puis on verse sans perte la solution dans une éprouvette de 500 cm³. On complète à 150 cm³ (volume primitif du sérum) avec de l'eau distillée.

2° *Floculation de la sérum-globuline.* — On procède alors aux essais de floculation de la sérum-globuline :

A cet effet on répartit dans 6 tubes à hémolyse placés sur un porteoir 0 cm³ 5 par tube de la solution des protéines puis on fait tomber dans le premier de l'acide HCl $\frac{N}{100}$ dixième par dixième en mélangeant chaque fois avec précaution jusqu'à ce que se produise un trouble uniforme. Ce trouble indique le début de la floculation de la globuline.

On ajoute alors dans chacun des autres tubes la même quantité d'acide augmentée chaque fois de $\frac{1}{10}$ cm³ d'acide en plus.

On laisse reposer une demi-heure environ.

Une fois les floculats bien déposés par eux-mêmes ou en s'aidant de centrifugation dans les tubes mêmes, on cherche quel est le tube ne donnant aucune opalescence par addition d'acide ou de base $\frac{N}{100}$. Le volume d'acide employé pour ce tube est le volume cherché.

On calcule alors la quantité d'acide HCl $\frac{N}{10}$ qui doit être ajoutée au volume restant de la solution.

Le mélange est rendu homogène en renversant doucement deux ou trois fois l'éprouvette bien fermée par la paume de la main. On rince les parois de l'éprouvette avec

quelques centimètres cubes d'eau distillée et on porte le volume à 450 cm³, c'est-à-dire *au volume triple du sérum primitif*.

Cette dilution conduit (voir 1^{re} partie), à la floculation complète de la sérum-globuline, dans le cas d'un sérum normal.

Après 24 heures de repos à 0°, on sépare celle-ci par centrifugation suivie de 3 ou 4 lavages à l'eau distillée.

La globuline est desséchée sur vide sulfurique ou redispersée dans l'eau en présence de NH³ dont l'excès peut-être ensuite enlevé totalement par dessiccation au vide sulfurique.

3° *Séparation de la myxoprotéine*. — La séparation de la myxoprotéine d'avec le sérum-albumine est faite sur la liqueur ainsi complètement débarrassée de la globuline.

Ici encore il importe d'opérer à basse température.

Nous avons exécuté la plupart de nos expériences sur les protéines dans un laboratoire frigorifique maintenu entre — 1 et + 1°, qu'a fait aménager M. Piettre au Laboratoire des Halles. Il comprend en outre une chambre à basses températures (— 8° à — 15°), et même un bac à circulation de saumure froide pour la préparation de glace. Une installation de ce genre est désormais indispensable pour les recherches rigoureuses sur les substances protéiniques qu'il s'agisse simplement de les conserver une fois isolées, et surtout de réduire au minimum pendant les manipulations toute action de condensation par l'acétone ou surtout l'alcool. La myxoprotéine en particulier est très sensible à ces actions.

Après refroidissement à 0° et addition de la première eau de lavage de la globuline, la liqueur formant environ un volume de 450 cm³ est additionnée peu à peu en agitant vivement de son volume d'acétone refroidi à 0°.

On centrifuge rapidement en ayant soin de refroidir

préalablement les tubes centrifugeurs. Le mieux serait évidemment de centrifuger dans une atmosphère constamment maintenue froide par une circulation de saumure.

Les culots de centrifugation sont alors repris par un volume d'eau distillée correspondant *au double du volume* de la liqueur protéinique initiale, c'est-à-dire 300 cm³ environ en ayant soin de bien écraser les particules solides du précipité acétonique.

La sérum-albumine se disperse rapidement et la myxoprotéine se dépose peu à peu sous forme de flocons gris caractéristiques, se réunissant en quelques heures, en une masse gélatineuse blonde, au fond de l'éprouvette où elle se rétracte par synérèse comme un caillot. Le séjour au froid augmente la viscosité de ce dépôt et surtout son adhésion aux parois de l'éprouvette.

Après 24 heures on peut décanter complètement la liqueur claire sans entraîner en aucune façon le précipité de myxoprotéine.

Dans les mêmes conditions on renouvelle deux ou trois précipitations acétoniques jusqu'à ce que la reprise par l'eau ne donne plus de floculat.

On note que les caractères des précipités successifs sont un peu différents, les derniers étant moins visqueux et plus fluides.

Ils peuvent être lavés puis séchés sur vide sulfurique ou réunis en un échantillon moyen.

PURIFICATION. — La purification de la myxoprotéine est obtenue par des lavages successifs à l'eau distillée, suivis de centrifugation.

Elle est rendue assez pénible en raison des caractères physiques de cette matière visqueuse qui adhère fortement aux parois du récipient et aux agitateurs.

M. Pieltre a reconnu que l'élimination de toute trace de sérum-albumine exige de nombreux lavages (5 à 6 au minimum). D'autre part la solubilité de la myxoprotéine

dans l'eau quoique faible, n'est pas négligeable et on s'expose en insistant exagérément à des pertes de poids appréciables.

La meilleure manière de conserver toutes les protéines est de les sécher sur vide sulfurique, en n'oubliant pas cependant que ce mode de conservation leur laisse un degré d'hydratation nettement différent d'une dessiccation au bain-marie bouillant ou à l'étuve au-dessus de 100°.

Achard et Piettre (1) ont montré pour la mucine articulaire notamment, des variations intéressantes dans cet ordre d'idées suivant les températures dans lesquelles a lieu le séchage :

Une « mucine » de veau séchée sur vide sulfurique, pulvérisée puis portée à l'étuve, a perdu, pour trois échantillons portés respectivement à :

105°	9,5 pour cent de son poids		
107°	10,7	—	—
109°	11,2	—	—

Les protéines du sérum perdent dans les mêmes conditions de 6 à 9,5 % en moyenne d'eau par dessiccation à 105-107°. Cette notion mérite d'attirer l'attention au point de vue analytique.

II. — Essais de préparation de la myxoprotéine par dialyse aqueuse ou par électrodialyse soit de la solution totale des protéines soit après séparation de la sérum-globuline.

EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES SUR LA DIALYSE AQUEUSE SIMPLE DU SÉRUM TOTAL.

Nous avons tout d'abord étudié rapidement les effets de la dialyse aqueuse faite sur le sérum total.

1. Achard et Piettre, C. R. sur quelques propriétés physiques et chimiques de la mucine des synoviales articulaires, t. 194, p. 2, 1932.

Dans une note (1) consacrée spécialement à ce sujet, M. Pieltre a obtenu des résultats très intéressants sur le rôle des électrolytes et plus particulièrement des non-électrolytes pour la stabilité des protéines dans le milieu complexe qu'est le sérum.

Il a constaté :

1^o Que l'élimination des électrolytes diffusibles (NaCl, sel pris comme témoin) une fois achevée, la proportion de substances protéiniques insolubilisées était relativement faible.

2^o Qu'il s'agissait de mélanges variables de sérum-globuline et de myxoprotéine souillés de petites quantités de sérum-albumine entraînée.

3^o Enfin qu'il restait encore 75 % de globuline dispersée. Il a cherché la raison de la stabilité des protéines restées en solution et il l'a trouvée dans la présence *des lipides*.

En effet, si les liqueurs une fois dialysées avec soin sont séchées sur vide sulfurique puis broyées et épuisées par de l'éther sec, on constate en les redispersant dans de l'eau distillée, l'apparition d'une abondante floculation de protéines. En même temps les éthers qui ont servi aux extractions abandonnent par évaporation des substances lipodiques.

Nous citons une expérience très démonstrative de Pieltre portant sur 6 gr. 4929 de matière sèche ; il a obtenu les séparations suivantes :

	Protéines floculés	Lipides enlevés par l'éther
Premier traitement éthéré . . .	4 gr. 3792	0,0452
Deuxième traitement éthéré ..	1 gr. 1501	0,0382
Troisième traitement éthéré ..	0 gr. 1632	0,0272

1. M. Pieltre, C. R. des Séances de l'Académie des Sciences, séance du 28 avril 1930, p. 1012-1013.

Sans doute, la simple dialyse aqueuse, bien moins active que l'électrodialyse, laisse encore dans la liqueur de petites quantités de carbonates alcalins mais il résulte des faits que la stabilité du milieu sérique, est due surtout aux lipides et c'est là une notion particulièrement importante en biologie (1).

Nous avons refait dans les mêmes conditions deux expériences.

EXPÉRIENCE I.

(*Sérum de bœuf.*)

Sérum de bœuf nivernais mis en œuvre : 100 cm³.

Extrait sec % = 9 gr 6 %.

Durée de dialyse : 99 heures.

Après centrifugation on obtient 175 cm³ de liqueur sérique qui, desséchée sur vide sulfurique, donne : 7 gr. 240 de matière sèche. Cette dernière soumise à trois épuisements à l'éther suivie de 3 reprises par l'eau donne :

	Protéines floc.	Lipides enlevés à l'éther
Premier traitement éthéré ...	1 gr. 4264	0 gr. 0614
Deuxième traitement éthéré !.	1 gr. 2890	0 gr. 0421
Troisième traitement éthéré ..	0 gr. 1741	0 gr. 0364

EXPÉRIENCE II.

(*Sérum de cheval.*)

Volume de sérum de cheval mis à dialyser : 100 cm³.

Extrait sec : 8 gr 89 %.

Durée de dialyse : 120 heures.

Volume final de la liqueur sérique après centrifugation : 183 cm³.

Après dessiccation sur vide sulfurique on obtient : 6 gr. 1282 de matière sèche.

1. Ce rôle des lipides doit être rapporté bien plus à leurs propriétés ou liaisons physiques qu'à leurs propriétés chimiques. En effet ces substances une fois isolées (dans la méthode à l'acétone) même à basse température après évaporation de l'alcool et de l'éther ne se redispersent que très incomplètement par addition d'eau même en présence des sels entraînés dans l'extrait acétonique aqueux.

Cette matière après trois épuisements à l'éther sec suivis de trois reprises par l'eau, donne :

	Poids des protéines	Lipides enlevés à l'éther
Premier traitement étheré . .	0 gr. 9482	0 gr. 0217
Deuxième traitement étheré . .	0 gr. 7119	0 gr. 0206
Troisième traitement étheré . .	0 gr. 1436	0 gr. 0048

A. — Dialyse aqueuse simple.

La dialyse aqueuse simple en vue de la préparation de la myxoprotéine a été faite dans les conditions suivantes :

La membrane dialysante employée est de la cellophane (viscose gonflée à la glycérine), de porosité plus régulière que le collodion quoique assez variable suivant les échantillons.

Les expériences sont effectuées dans le laboratoire frigorifique aux environs de 0°.

L'épaisseur qu'occupe le liquide à dialyser dans le dialyseur est très faible de 3 à 5 mm.

La durée moyenne a été de 5 à 6 jours avec un changement d'eau toutes les 8 ou 10 heures.

Chaque dialyse était poussée jusqu'à ce que la dernière eau après concentration au bain-marie ne révèle plus que des traces de chlorures.

DIALYSE SUR LA SOLUTION AQUEUSE DES PROTÉINES TOTALES.

Lorsqu'on a soumis 100 cm³ de solution protéinique totale à la dialyse dans les conditions indiquées précédemment on constate :

1° Une augmentation importante du volume initial, qui peut aller à près du double du volume mis en œuvre.

2° Un floculat plus ou moins adhérent au septum du dialyseur.

Le floculat bien que blanc grisâtre est constitué, comme dans le cas du sérum entier, par un mélange des 3 protéines ; la sérum-albumine représentant seulement un élément d'entraînement que l'on peut séparer par lavages à l'eau distillée. La plus grande partie est constituée par de la sérum-globuline, la présence de myxoprotéine est décelée par l'action d'une solution salée de 10 ‰ qui permet de la séparer assez incomplètement du reste de la globuline.

La liqueur débarrassée de floculat par centrifugation est consacrée à l'étude :

a) des protéines restées dispersées ;

b) des électrolytes encore présents.

a) *Ces protéines* sont isolées par la technique habituelle : floculation de la sérum-globuline, précipitation acétonique en vue de la séparation de la myxoprotéine et de la sérum-albumine.

b) *Les électrolytes* sont dosés par les méthodes usuelles ; les alcalis après évaporation du liquide et calcination à basse température sont titrés par des solutions acides titrées en présence du rouge de méthyle, à l'ébullition.

On ne constate en général que des traces de chlorure.

EXPÉRIENCE I.

(Sérum de bœuf nivernais, 5 ans 1/2).

Volume de sérum mis en œuvre : 150 cm³.

Les protéines séparées sont reprises par le volume primitif d'eau, centrifugées pour obtenir une solution parfaitement limpide.

1° a) La teneur en matière sèche faite sur 3 cm³ donne un extrait : 1 gr. 413.

Soit % : 7 gr. 065.

b) L'acidité de floculation (qui donne l'alcalinité approximative retenue par les protéines) est déterminée comme d'habitude sur 6 prises d'essai de 0 cm³ 5 chacune :

Elle est de $3 \text{ cm}^3 \text{ HCl } \frac{\text{N}}{100}$ pour 1 cm^3 de solution.

Soit : $30 \text{ cm}^3 \text{ HCl } \frac{\text{N}}{10}$ pour 100 cm^3 de solution.

Soit exprimée en NaOH $\frac{\text{N}}{10}$: $30 \text{ cm}^3 \text{ NaOH } \frac{\text{N}}{10}$.

2° La dialyse est faite sur un volume de 50 cm^3 de protéines totales au volume du sérum primitif.

Elle est prolongée 100 heures, avec 9 renouvellements de l'eau de dialyse.

Le volume final de liqueur contenu dans le dialyseur à la fin de l'opération a été de 69 cm^3 .

Il reste un flocculat blanc gris.

a) Le flocculat protéinique sur le dialyseur, séparé par centrifugation lavé donne un sec de 0 gr. 9885.

Soit : $0 \text{ gr. } 9885 \times 2 = 1 \text{ gr. } 977$ pour 100 cm^3 de solution.

b) Liqueur surnageante forme un volume de 68 cm^3 .

Réaction faiblement alcaline au tournesol sensible gallois.

La détermination de l'acidité de floculation donne :

$0 \text{ cm}^3 \text{ 8 HCl } \frac{\text{N}}{100}$ pour 1 cm^3 de liqueur.

Soit : $8 \text{ cm}^3 \text{ HCl } \frac{\text{N}}{10}$ pour 100 cm^3 de liqueur.

Soit exprimée en NaOH $\frac{\text{N}}{10}$: $8 \text{ cm}^3 \text{ NaOH } \frac{\text{N}}{10}$.

En résumé, partant d'un extrait sec de 7 gr. 065 pour 100 de sérum et d'une acidité de floculation (exprimée en NaOH $\frac{\text{N}}{10}$) de $30 \text{ cm}^3 \text{ NaOH } \frac{\text{N}}{10}$

$\frac{\text{N}}{10}$ on arrive par la dialyse aux résultats suivants rapportés à 100 cm^3 de solution protéinique totale :

Protéines : $7 \text{ gr. } 065 - 1 \text{ gr. } 977 = 5 \text{ gr. } 088$.

Acidité de floculation : $30 \text{ cm}^3 - 8 \text{ cm}^3 = 22 \text{ cm}^3 \text{ NaOH } \frac{\text{N}}{10}$.

Le flocculat est un mélange de globuline et de myxoprotéine, la sérum-albumine a été éliminée par lavages à l'eau distillée.

EXPÉRIENCE II.

(Sérum de cheval).

Volume de sérum mis en œuvre : 150 cm³.

Les protéines séparées sont reprises par 150 cm³ d'eau distillée puis centrifugées pour obtenir une liqueur limpide.

1^o a) Extrait sec sur 5 cm³ : 0 gr. 407.

Soit % : 8 gr. 15.

b) Acidité de floculation :

Elle est de : 1 cm³, 8 HCl $\frac{N}{100}$ pour 1 cm³ de solution.

Soit : 18 cm³ HCl $\frac{N}{10}$ pour 100 cm³ de solution.

Soit exprimée en NaOH $\frac{N}{10}$: 18 cm³ NaOH $\frac{N}{10}$.

2^o Volume de solution soumis à la dialyse : $v = 50$ cm³.

Durée de dialyse : 124 heures, avec 12 changements d'eau.

Volume final après dialyse : $v' = 72$ cm³.

a) Le floculat protéinique séparé par centrifugation puis lavé donne un extrait sec de : 1 gr. 6217 pour 50 cm³ de solution.

Soit : 1 gr. 6217 $\times 2 = 3$ gr. 2434 pour 100 cm³ de solution.

b) Liqueur surnageante : volume = 68 cm³.

Détermination de l'acidité de floculation : elle donne :

0 cm³ 50 HCl $\frac{N}{100}$ pour 1 cm³.

Soit : 5 cm³ HCl $\frac{N}{10}$ pour 100 cm³.

Soit exprimée en NaOH $\frac{N}{10}$: 5 cm³ NaOH $\frac{N}{10}$.

En résumé, par dialyse on obtient les résultats suivants rapportés à 100 cm³ de solution protéinique totale :

Poids de protéines : 8 gr. 15 — 3 gr. 2434 = 4 gr. 9066.

Acidité de floculation (exprimée en NaOH $\frac{N}{10}$) :

18 cm³ — 5 cm³ = 13 cm³ NaOH $\frac{N}{10}$.

La dialyse a éliminé la totalité des chlorures mais seulement 13 cm³ de NaOH $\frac{N}{10}$ de l'alcalinité primitive (mesurée à la floculation).

Le floculat a les mêmes caractères que celui de l'expérience I.

EXPÉRIENCE III.

(Sérum de vache).

Volume de sérum mis en œuvre : 150 cm³.

Les protéines séparées sont reprises par 150 cm³ d'eau distillée puis centrifugées :

1° a) Extrait sec sur 5 cm³ : 0 gr. 346.
Soit % : 6 gr. 92.

b) Acidité de floculation :

Elle est de 2 cm³ 9 HCl $\frac{N}{100}$ pour 1 cm³ de solution.

Soit : 29 cm³ HCl $\frac{N}{10}$ pour 100 cm³ de solution.

Soit exprimée en NaOH $\frac{N}{10}$: 29 cm³ NaOH $\frac{N}{10}$.

2° Volume de solution soumis à la dialyse : $v = 50$ cm³.

Durée de dialyse : 180 heures avec 12 changements d'eau.

Volume final après dialyse : $v' = 81$ cm³.

a) Poids du floculat protéinique : 1 gr. 0417 pour 50 cm³ de solution.
Soit 1 gr. 0417 $\times 2 = 2$ gr. 0834 pour 100 cm³ de solution.

b) Liqueur surnageante : volume 78 cm³.

Détermination de l'acidité de floculation : Elle est de :

0 cm³ 90 HCl $\frac{N}{100}$ pour 1 cm³.

Soit : 9 cm³ HCl $\frac{N}{10}$ pour 100 cm³.

Soit exprimées en NaOH $\frac{N}{10}$: 9 cm³ NaOH $\frac{N}{10}$.

En résumé, par dialyse on obtient les résultats suivants (rapportés à 100 cm³ de solution protéinique totale) :

Poids de protéines : 6 gr. 92 — 2 gr. 0834 = 4 gr. 086.

Acidité de floculation (exprimée en NaOH $\frac{N}{10}$:

29 cm³ — 9 cm³ = 20 cm³ NaOH $\frac{N}{10}$.

On a donc éliminé plus de trois fois le volume d'alcali correspondant à l'alcalinité de floculation initiale.

Le floculat obtenu est presque blanc.

EXPÉRIENCE IV.

(Sérum de bœuf).

Volume de sérum mis en œuvre : 150 cm³.

Les protéines séparées sont reprises par 150 cm³ d'eau et centrifugées.

1° a) L'extrait sec sur 5 cm³ : 0 gr. 413.

Soit % : 8 gr. 27.

b) Acidité de floculation :

Elle est de 3 cm³ HCl $\frac{N}{100}$ pour 1 cm³ de solution.

Soit : 30 cm³ HCl $\frac{N}{10}$ 100 cm³ pour 100 cm³ de solution.

Soit exprimée en NaOH $\frac{N}{10}$: 30 cm³ NaOH $\frac{N}{10}$.

2° Volume de solution soumis à la dialyse : 50 cm³.

Durée de la dialyse : 90 heures avec 7 changements d'eau.

Volume final après dialyse : v' = 67 cm³.

a) Poids du flocculat protéinique : 1 gr. 6418 pour 50 cm³ de solution.

Soit % : 3 gr. 2836.

b) Liqueur surnageante : volume 64 cm³.

Détermination de l'acidité de floculation : Elle est de 12 cm³ 2 HCl $\frac{N}{100}$ pour 1 cm³.

Soit : 12 cm³ HCl $\frac{N}{10}$ pour 100 cm³ de liqueur.

Soit exprimée en NaOH $\frac{N}{10}$: 12 cm³ NaOH $\frac{N}{10}$.

En résumé, on obtient par dialyse les résultats suivants (rapportés à 100 cm³ de solution protéinique totale) :

Poids de protéines : 8 gr. 27 — 3 gr. 2836 = 4 gr. 9864.

Acidité de floculation (exprimée en NaOH $\frac{N}{10}$) :

$$30 \text{ cm}^3 - 12 \text{ cm}^3 = 18 \text{ cm}^3 \text{ NaOH } \frac{N}{10}.$$

EXPÉRIENCE V.

(Sérum de bœuf).

Volume du sérum mis en œuvre : 150 cm³.

Les protéines séparées sont dissoutes dans 150 cm³ d'eau distillée puis centrifugées.

1° a) Extrait sec sur 5 cm³ : 0 gr. 37 .

Soit % : 7 gr. 432.

b) Détermination de l'acidité de floculation : elle est de 1 cm³ 8 HCl pour 1 cm³ ; 18 cm³ HCl $\frac{N}{10}$ pour 100 cm³.

Soit exprimée en NaOH $\frac{N}{10}$: 18 cm³ NaOH $\frac{N}{10}$.

2° Volume de solution soumis à la dialyse : 50 cm³.

Durée de la dialyse : 80 heures avec 8 changements d'eau.

Volume final après dialyse : v' = 66 cm³ 5.

a) Poids du flocculat protéinique : 1 gr. 073 pour 50 cm³ de solution.

Soit : 2 gr. 146 pour 100 cm³ de solution.

b) Liqueur surnageante : volume 68 cm³.

Détermination de l'acidité de floculation : elle est de : 1 cm³ HCl $\frac{N}{100}$ pour 1 cm³.

Soit : 10 cm³ HCl $\frac{N}{10}$ pour 100 cm³ de liqueur.

Soit exprimée en NaOH $\frac{N}{10}$: 10 cm³ NaOH $\frac{N}{10}$.

En résumé, on obtient les résultats suivants rapportés à 100 cm³ de liqueur protéinique totale :

Poids des protéines : 7 gr. 432 — 2 gr. 146 = 5 gr. 286.

Acidité de floculation (exprimée en NaOH $\frac{N}{10}$) :

$$18 \text{ cm}^3 - 10 \text{ cm}^3 = 8 \text{ cm}^3 \text{ NaOH } \frac{N}{10}.$$

CONCLUSIONS. — L'examen comparatif des expériences précédentes met en évidence les faits suivants :

1° La quantité des protéines flocculées au cours de la dialyse oscille autour de 1/3 des protéines totales.

2° Les chlorures disparaissent en totalité si la dialyse est suffisamment prolongée et surtout si les eaux sont souvent renouvelées. Le plus souvent on n'a constaté que la présence des traces de chlorures et cela après concentration de la dernière eau de dialyse.

3° L'alcalinité entraînée par dialyse est assez variable suivant la durée. D'une façon générale cependant (sauf dans l'expérience V) elle dépasse les $\frac{2}{3}$ de l'alcalinité totale de la solution protéinique avant dialyse.

Il faut remarquer qu'il ne s'agit pas ici d'alcalinité au sens absolu du mot, mais d'alcalinité relative, c'est-à-dire correspondant à l'optimum de floculation de la globuline.

En somme nous mesurons arbitrairement ici une réaction chimique par un phénomène physique dont la nature est mal connue.

Comme nous l'avons dit, en effet, plus haut, la floculation de la globuline s'accompagne de deux phénomènes bien différents : une réaction chimique, neutralisation par l'acide chlorhydrique des carbonates alcalins entraînés par les protéines avec équilibres variables entre HCl et CO_2 ; et un phénomène physique qui est la floculation de la globuline.

Comment expliquer que cette élimination considérable de l'alcalinité n'entraîne qu'une précipitation relativement faible de protéines, en particulier de la globuline puisqu'il en reste encore en suspension près de 75 % ?

Ici on ne peut invoquer le rôle stabilisateur des lipides, puisqu'ils ont été éliminés en très grande partie pendant la précipitation acétonique et surtout par des lavages à l'éther.

Il est donc logique d'invoquer deux raisons :

La première qui ressort de nos expériences tient à l'élimination assez incomplète (les $\frac{2}{3}$) des alcalis. La dialyse aqueuse simple se révèle donc nettement insuffisante sauf en ce qui concerne les électrolytes très diffusibles comme les chlorures. Les carbonates au contraire, et sans doute de très petites quantités de phosphates, restent fixés énergiquement aux protéines, surtout à la sérum-globuline, et les maintiennent partiellement à l'état dispersé.

La deuxième raison est que les protéines se stabilisent

réciiproquement. Ce fait a été particulièrement mis en lumière par M. Piettre en ce qui concerne la myxoprotéine et la sérum-albumine. On ne parvient à les séparer que par des précipitations acétoniques répétées. Ce point mérite de nouvelles recherches à l'aide de la technique physico-chimique.

4^o Enfin, l'étude du flocculat protéinique montre qu'on se trouve en présence d'un mélange de sérum-globuline et de myxoprotéine qu'il est bien difficile de séparer d'une façon suffisamment exacte par le procédé indiqué plus haut par M. Piettre.

En résumé, la dialyse, si elle donne des indications précieuses sur divers points intéressants, ne conduit pas aux résultats que nous cherchions : l'obtention sinon de la totalité de la myxoprotéine, du moins d'une proportion intéressante et à l'état suffisant de pureté.

B. — Dialyse après floculation aux acides de la sérum-globuline.

Nous avons donc, sur les conseils de M. Piettre qui était déjà parvenu dans quelques expériences à obtenir des résultats encourageants, fait précéder la dialyse aqueuse d'une élimination de la sérum-globuline par la technique habituelle de floculation aux acides.

La solution ne contenant plus que la myxoprotéine et la sérum-albumine a été soumise à la dialyse dans les mêmes conditions que précédemment. Cependant pour ne pas opérer sur des dilutions trop étendues, nous avons flocculé le plus souvent la globuline dans un volume seulement double de celui du sérum primitif au risque d'obtenir avec la myxoprotéine des traces de globuline non totalement isolées.

EXPÉRIENCE I.

(Sérum de bœuf).

Volume de sérum mis en œuvre : 150 cm³.

Les protéines totales ramenées au volume primitif (150 cm³) sont débarrassées de la sérum-globuline. On porte le volume à 300 cm³ et on centrifuge.

On prélève sur la liqueur 100 cm³ que l'on met à dialyser au froid comme plus haut.

Durée de la dialyse : 100 heures avec 10 changements d'eau.

Dans le dialyseur on observe à la fin de l'opération :

1° Un beau dépôt de myxoprotéine gris, visqueux, adhérant fortement au septum.

2° Un liquide surnageant bien limpide d'un volume de 120 cm³.

a) *Traitement du dépôt* : Après avoir décanté avec soin la partie liquide on procède à l'enlèvement du dépôt avec un agitateur en verre muni de caoutchouc (doigt de Fresenius). L'opération est longue et pénible car la myxoprotéine adhère très fortement au septum. Il faut insister en s'aidant de notables volumes d'eau projetés en jets. On centrifuge la substance, la lave 3 ou 4 fois en l'émulsionnant le plus possible.

Après dessiccation sur vide sulfurique le dépôt de myxoprotéine a donné un poids de : 0 gr. 1820.

Soit $0,1820 \times 2 = 0$ gr. 364 ;

% 3 gr. 64.

b) *Traitement de la liqueur surnageante*. — La liqueur surnageante (volume 120 cm³) contenant encore de petites quantités de myxoprotéine et la totalité de la sérum-albumine est précipitée bien à froid par son volume d'acétone. On centrifuge rapidement à froid. Malheureusement on obtient toujours une émulsion, un sol acétonique plus ou moins complet.

1° Par centrifugation on isole la partie flocculée. On la reprend par de l'eau. Il se sépare une première portion de myxoprotéine laquelle après dessiccation au vide sulfurique donne : 0 gr. 0091.

2° L'émulsion est rompue par addition de traces de NaCl 8,5 % après repos au froid on centrifuge et reprend par de l'eau distillée pour séparer la myxoprotéine restante de la sérum-albumine.

Poids de la deuxième portion de myxoprotéine : 0 gr. 3031.

En résumé : pour 100 cm³ de sérum initial la quantité de myxoprotéine totale (dépôt de dialyse + myxoprotéines obtenues par précipitation

acétonique) est sensiblement $0 \text{ gr. } 364 + (0 \text{ gr. } 0091 + 0 \text{ gr. } 3031) = 0 \text{ gr. } 6762$.

Soit par litre de sérum : $6 \text{ gr. } 762$.

EXPÉRIENCE II.

(Sérum de taureau).

Volume de sérum mis en œuvre : 150 cm^3 .

Les protéines totales ramenées au volume primitif (150 cm^3) sont débarrassées de la sérum-globuline. On porte le volume à 300 cm^3 et centrifuge. On prélève sur la liqueur 100 cm^3 que l'on met à dialyser.

Durée de la dialyse : 140 heures avec 10 changements d'eau.

1° *Le dépôt de myxoprotéine* recueilli et lavé 3 fois par centrifugation donne, après dessiccation sur vide sulfurique un poids de : $0 \text{ gr. } 2430$ de matière pour 50 cm^3 de sérum initial.

Soit % : $0,2430 \times 2 = 0 \text{ gr. } 4860$;

% : 4 gr. 860.

2° *La précipitation acétonique* faite sur la liqueur surnageante débarrassée du dépôt de myxoprotéine donne, comme c'est la règle, après une forte déminéralisation du milieu, une émulsion partielle.

a) La reprise par l'eau du culot acétonique de centrifugation donne $0 \text{ gr. } 0118$ de myxoprotéine sèche.

Soit % : $0 \text{ gr. } 0236$;

% : $0 \text{ gr. } 236$.

b) L'émulsion est rompue par addition de 0 cm^3 , $2 \text{ HCl } \frac{\text{N}}{100}$ est après repos au froid centrifugée, puis reprise par 100 cm^3 d'eau. On obtient une deuxième portion de myxoprotéine. Cette dernière lavée, séchée donne un poids de : $0 \text{ gr. } 1245$.

Soit % : $0,1245 \times 2 = 0 \text{ gr. } 2490$;

% : 2 gr. 490.

La myxoprotéine totale (myxoprotéine de dépôt + myxoprotéines précipitées) rapportée au litre de sérum initial est donc : $4 \text{ gr. } 860 + (2 \text{ gr. } 36 + 2 \text{ gr. } 490) = 9 \text{ gr. } 710$.

EXPÉRIENCE III.

(Sérum de vache).

Volume de sérum mis en œuvre : 150 cm^3 .

Les protéines totales ramenées au volume primitif (150 cm^3) sont

débarrassées de sérum-globuline puis diluées à 300 cm³ et centrifugées. On prélève 100 cm³ de la liqueur que l'on met à dialyser.

Durée de la dialyse : 100 heures avec 12 changements d'eau.

1° Le dépôt de myxoprotéine isolé et lavé 4 fois par centrifugation donne, après dessiccation sur vide sulfurique un poids de : 0 gr. 2115.

Soit % : $0,2115 \times 2 = 0$ gr. 4230 ;

% : 4 gr. 230.

2° La liqueur surnageante formant après addition de la première eau de lavage un volume de 120 cm³ est précipitée par son volume d'acétone froide.

De nouveau on se trouve en présence d'une émulsion partielle donnant par centrifugation une émulsion acétonique et un culot.

a) La reprise par l'eau du culot de centrifugation donne 0 gr. 0917 de myxoprotéine.

Soit : $0,0917 \times 2 = 0$ gr. 1834 pour 100 cm³ sérum initial.

b) L'émulsion rompue par addition cette fois de son volume d'acétone centrifugée puis reprise par 100 cm³ d'eau permet d'obtenir : 0 gr. 1125 de myxoprotéine.

Soit : 0 gr. 1125 $\times 2 = 0$ gr. 2250 pour 100 cm³ de sérum initial.

Le poids total de myxoprotéine obtenu pour 100 cm³ de sérum est donc : 0 gr. 4230 + (0 gr. 1834 + 0 gr. 2250) = 0 gr. 8314.

Rendement par litre de sérum : 8 gr. 314.

EXPÉRIENCE IV.

(Sérum de cheval).

Extrait sec % : 8 gr. 15.

Volume de sérum mis en œuvre . 150 cm³.

Les protéines totales ramenées au volume primitif (150 cm³) sont débarrassées de la sérum-globuline (optimum de floculation 1 cm³,

8 HCl $\frac{N}{100}$ pour 1 cm³ solut.).

On porte le volume à 300 cm³ avec de l'eau distillée et on centrifuge.

On met à dialyser 100 cm³ ;

Durée de la dialyse : 115 heures avec 9 changements d'eau.

1° Dépôt de myxoprotéine légèrement teinté en rouge par l'hémoglobine provenant du sérum recueilli et lavé 3 fois par centrifugation donne après dessiccation sur vide sulfurique un poids de : 0 gr. 1710.

Soit : 0 gr. 1710 $\times 2 = 0$ gr. 3420 pour 100 cm³ de sérum.

Soit : 3 gr. 420 par litre de sérum.

2° La liqueur claire additionnée de sa première eau de lavage forme un volume de 125 cm³. On y ajoute son volume d'acétone bien refroidie.

L'émulsion partielle centrifugée donne :

a) Un très faible culot, qui, repris par 50 cm³ d'eau laisse déposer un poids insignifiant de myxoprotéine.

b) L'émulsion acétonique restante, rompue par addition de 0 cm³ 45 HCl $\frac{N}{100}$ est centrifugée puis reprise par 100 cm³ d'eau distillée on obtient : 0 gr. 1483 de myxoprotéine.

Soit : $0,1483 \times 2 = 0$ gr. 2966 par 100 cm³ de sérum.

Soit : 2 gr. 966 par litre de sérum.

Le poids total de myxoprotéine est donc : 0 gr. 3420 + 0 gr. 2966 = 0 gr. 6386 % de sérum.

Rendement de myxoprotéine par litre : 6 gr. 386.

CONCLUSIONS. — Ces quelques expériences fournissent plusieurs résultats intéressants :

1° Le plus important est certainement l'obtention d'une *technique très satisfaisante de préparation de la myxoprotéine*. On peut lui reprocher cependant les inconvénients suivants : d'abord de donner un rendement incomplet approchant des 75 % de la matière totale, ensuite de provoquer presque infailliblement des émulsions très désagréables à rompre et qui entraînent l'addition d'électrolytes dont il faut ensuite se débarrasser avec beaucoup de peine.

2° Enfin et surtout la dialyse est un procédé très long et qui, pratiquement ne peut être appliqué qu'à des volumes très faibles de 50 à 200 cm³.

Par contre cette technique a de précieux avantages :

Celui de donner un *produit pur, exempt de toute trace de globuline* lorsqu'on a précipité celle-ci à la dilution optimale indiquée et toutes les fois que le sérum mis en œuvre est un sérum normal.

D'autre part, elle écarte l'objection que quelques-uns formulaient jusque-là, avant les expériences de Sørensen,

sur l'emploi à froid de solvants tels que l'alcool. En effet il ne saurait être plus question ici d'action de condensation, de dénaturation par l'alcool ou surtout par l'acétone. La myxoprotéine ainsi obtenue, par un procédé aussi classique, aussi doux que la dialyse aqueuse, peut donc être considérée comme une protéine nouvelle du sérum de sang.

Cette conclusion nous paraît avoir une importance particulière.

III. — **Electrodialyse.**

L'idée d'employer l'électricité pour séparer les colloïdes des cristalloïdes et en particulier pour débarrasser les sols colloïdaux de leurs impuretés électrolytiques est due à Morse et Pierce (1), puis a été appliquée par Dhéré d'une façon très heureuse.

Ce savant a en effet montré, par des mesures de conductibilité électrique, qu'il est possible d'arriver à une élimination totale des électrolytes d'une solution colloïdale. C'est ainsi que la conductibilité d'un sérum de concentration de 15 % en protéines peut être abaissée dans l'espace de quelques heures d'une conductibilité de 27.10^{-6} (dialyse aqueuse) à $7,6 \cdot 10^{-6}$.

Les travaux de Dhéré (2) ont suscité de toutes parts de multiples recherches tendant à faire de l'électrodialyse un procédé industriel de purification des colloïdes, des enzymes, de concentration des sérums thérapeutiques, etc...).

Le *principe* de l'électrodialyse est fort simple : il consiste essentiellement en une électrolyse dans un milieu colloïdal au moyen d'un dispositif permettant l'entraîne-

1. H. W. Morse et G. W. Pierce, *Zeitschr. f. physikalische Chem.*, XLV, 1903, p. 606.

2. Dhéré, Sur l'électrodialyse 783. *Biochem Zeit.*, t. 153, p. 504-505, 1924. C. R. Acad. des Sciences, p. 934-993, 1910.

ment des ions dialysables avec de l'eau distillée et à suivre les variations de la conductibilité de ce milieu avec le temps.

Nous avons utilisé dans un nombre malheureusement trop petit d'expériences cette méthode en l'appliquant d'abord à la solution totale des protéines préparées par la méthode à l'acétone et nous proposant plus tard de la pratiquer comme pour la dialyse aqueuse, après floculation de la sérum-globuline.

Comme on le sait l'électrodialyse doit être suivie pas à pas et complétée par la mesure de la conductibilité électrique des liqueurs mises en œuvre.

DISPOSITIF EMPLOYÉ.

L'appareil dont nous nous sommes servi et qui nous a été très aimablement confié par notre excellent confrère et ami BOUTROUX se compose essentiellement (voir schéma page 78) :

1^o d'un cylindre en verre à extrémités ouvertes de 15 cm. de long sur 7 cm. de diamètre; évasé à la partie inférieure et muni d'une tubulure à la partie supérieure.

2^o De deux entonnoirs portant chacun un fil de platine servant d'électrode.

Ces pièces une fois montées forment ainsi trois compartiments séparés par deux rondelles de cellophane servant de membranes dialysantes : le compartiment central cylindrique est destiné à contenir le liquide à dialyser.

Dans les deux autres où se trouvent les électrodes, passe un courant d'eau distillée qui, arrivant en *a*, s'écoule en *b* après avoir traversé les deux compartiments.

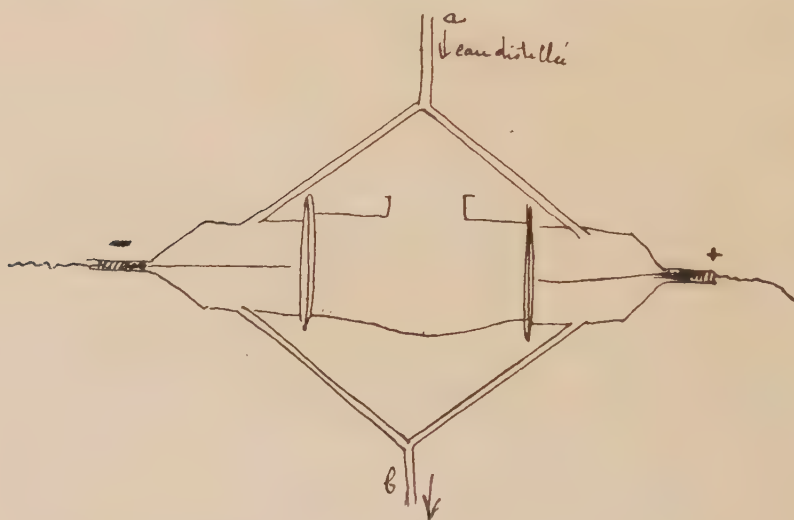
Cette circulation d'eau a pour effet d'entraîner au fur et à mesure de la dialyse les ions diffusibles. Elle a également pour but d'opposer par sa résistance à l'échauffement de la solution colloïdale.

Les électrodes de platine sont disposées de telle façon qu'une des extrémités libres affleure la membrane dialysante, l'autre fixe est en contact avec une couche de mercure contenue dans la douille de l'entonnoir.

Le courant environ 80 volts est fourni par une batterie d'accumulateurs.

Un rhéostat permet de maintenir toujours le voltage à une valeur convenable indiquée par un galvanomètre gradué au millivolt.

L'opération est effectuée toutes les fois qu'il est possible



à 0° en chambre froide pour éviter l'échauffement de la liqueur à dialyser.

Cette condition est nécessaire quand on dialyse des solutions de protéines facilement altérables.

TECHNIQUE.

On verse donc dans le cylindre central, par la tubulure, 50 cmc. de solution protéinique totale de concentration

connue. On fait passer le courant en veillant à ce qu'il ne dépasse pas 80 volts et en ayant soin de faire circuler pendant toute la dialyse un fort courant d'eau distillée.

Au bout de 48 heures environ on arrête la dialyse et mesure la conductibilité électrique de la solution au moyen de l'appareil bien connu de Kohlraush.

EXPÉRIENCE I.

(*Sérum de bœuf*).

(Electrodialyse sur les Protéines totales).

Extrait sec du sérum de bœuf : 96,34 %.

On part de 50 cm³ de protéines totales dont la teneur en extrait sec est de 7 gr. 5 %, préparées par la méthode à l'acétone.

Durée de l'électrodialyse : 48 heures.

Température 18° (temp. du laboratoire).

Voltage : 80 volts.

Après 3 heures le galvanomètre marque		10 millivolts
Après 10 heures le galvanomètre marque		20 millivolts
Après 24 heures le galvanomètre marque		60 millivolts

Au bout de 48 heures on arrête l'expérience et on mesure la conductibilité sur un volume de 10 cm³ de la solution.

La détermination de la conductibilité a donné : après 48 heures 2,5.10⁻⁶ chiffre très voisin de la conductibilité spécifique de l'eau usuelle soit 10⁻⁵ × 2.

Les modifications survenues dans la solution des protéines ont été suivies avec beaucoup de soin pendant toute la durée de l'expérience.

A la fin de la dialyse on observe :

1° Un floculat de protéines volumineux non homogène d'aspect et de coloration qui s'accumule au fond de la partie évasée du cylindre central et au-dessus la présence.

2° D'un liquide surnageant limpide, légèrement citrin.

Par centrifugation on sépare avec soin les deux parties :

1. *Floculat*. — Le floculat se composait de 2 couches très nettes, une supérieure grenue, blanchâtre, ayant les caractères de la sérum-globuline, l'autre sous-jacente forme de volumineux flocons grisâtres rappelant très nettement les propriétés de la myxoprotéine.

Le floculat est centrifugé puis lavé deux fois. La substance séchée

sur vide sulfurique puis bien pulvérisée est mise en suspension dans 50 cm³ d'une solution à 8 gr. 5 % de NaCl. Après 8 heures de contact et de fréquentes agitations ou centrifuge. L'insoluble était de la globuline, la myxoprotéine étant dispersée dans la liqueur salée.

Il s'agissait donc bien nettement d'un mélange de 2 protéines.

2. *Liqueur surnageante.* — La liqueur légèrement jaunâtre était alcaline au rouge de méthyle virant, au violet avec le bleu thymol par conséquent de pH compris entre 6 et 6,5.

Elle est portée à un volume de 45 cm³ avec l'eau de lavage.

L'extrait sec fait sur 5 cm³ donne : 0 gr. 7235. Il était donc resté en solution un poids de protéines de 1 gr. 1115.

Les 40 cm³ restants sont traités à froid par un égal volume d'acétone. On n'observe cependant pas ici d'émulsion en dépit de la forte déminéralisation du milieu, il faut donc attribuer un rôle important à la *myxoprotéine dans la production de ces émulsions de ces sols acétoniques*. Le culot acétonique est repris par 50 cm³ d'eau distillée et donne :

a) un flocculat de myxoprotéine caractéristique qui, lavé, séché puis pesé donne un poids de : 0 gr. 00535 ;

et b) une solution limpide qui, séchée sur vide sulfurique donne un résidu de : P = 0 gr. 7652. On a vérifié qu'il s'agissait de sérum-albumine.

Cette première expérience a donc conduit à deux résultats :

1^o de provoquer une floculation de la totalité de la globuline et de la plus grande partie de la myxoprotéine ;

2^o la sérum-globuline calcinée en capsule de platine *ne laisse pas de cendres blanches* de CaO comme c'est la règle.

L'électrodialyse si elle a éliminé les sels du sérum (chlorures carbonates, phosphates) a donc également *enlevé le calcium* constituant normal de cette protéine et qui paraît d'ailleurs assez labile puisqu'il est enlevé aisément par l'oxalate d'ammoniaque et pourrait peut-être éliminer par des moyens physiques.

EXPÉRIENCE II.

(*Sérum de bœuf*).

Extrait sec de sérum % : 8 gr. 82.

50 cm³ de protéines totales donnant un extrait sec de 6 gr. 89 % sont soumis à l'électrodialyse.

Durée : 60 heures.

Température : 0°.

Voltage : 80.

Au bout de 60 heures conductibilité de 10 cm³ de la solution est de : 3,410.⁻⁵ sensiblement voisine de celle de l'eau.

1° Culot : est un mélange de globuline et de myxoprotéine séparées par NaCl 8,5 %.

2° Liqueur surnageante : possède les mêmes caractères que dans l'expérience I.

Elle forme avec de l'eau de lavage un volume de 38 cm³, extrait sec sur 5 cm³ : 0 gr. 5328.

Le poids des protéines restées en solution était donc : 0 gr. 9894.

Les 33 cm³ restants sont précipités par leur volume d'acétone sans émulsion ici encore. Le culot acétonique repris par 40 cm³ d'eau donne :

1° un flocculat de myxoprotéine très caractéristique qui, lavé, séché et pesé donne : 0 gr. 00216 ;

2° une solution limpide qui, séchée sur vide sulfurique donne un résultat de : 0 gr. 4281 de sérum-albumine.

CONCLUSIONS.

Ces premiers résultats bien que tout à fait insuffisants montrent les avantages qu'il y a à effectuer l'électrodialyse non plus sur le sérum normal avec de nombreux composants comme l'ont fait plusieurs auteurs, mais sur la solution des protéines.

L'élimination en particulier des lipides par le traitement à l'acétone conduit d'un seul coup après une rapide floculation de la globuline et de la myxoprotéine à la sérum-albumine presque pure.

Il faut cependant faire remarquer à nouveau que l'électrodialyse va trop loin, puisqu'elle élimine le *Ca* de la sérum-albumine.

En outre il y a lieu de faire des réserves sur les modifications que la présence des ions peut imposer pendant leur transport à la cathode ou à l'anode, à des substances aussi complexes et aussi délicates que les substances protéidiques. Cette question délicate a été encore à peine abordée.

Quoi qu'il en soit, les constatations que nous indiquons paraissent devoir rendre possible l'emploi de l'électrodialyse pour le but que nous cherchons : la séparation pratique de la myxoprotéine.

M. Piettre pense que cette technique appliquée non plus à la solution des protéines totales mais après l'élimination de la globuline par floculation acide, conduirait à l'obtention de la myxoprotéine à l'état pur et nous nous proposons de diriger plus tard nos recherches dans ce sens.

Comparaison des différents procédés de préparation de la myxoprotéine.

Nous venons d'étudier différentes techniques pour la préparation de la myxoprotéine.

Une rapide comparaison des rendements par chacune de ces techniques nous permettra de choisir celle qui paraît la plus avantageuse et plus pratique.

1. — PRÉCIPITATION ACÉTONIQUE, APRÈS ÉLIMINATION DE LA SÉRUM-GLOBULINE PAR FLOCCULATION AUX ACIDES.

Voici pour quelques expériences les résultats obtenus :

*Myxoprotéine séchée sur vide sulfurique rapportée à un litre
de sérum.*

Sérums normaux d'abattoir	1 ^{re} précipitation en gr.	2 ^e et 3 ^e précipitation en gr.
Bœuf	10,7	0,728
Bœuf	9,3	0,913
Taureau	12,4	1,133
Vache	10,2	0,272
Cheval	10,8	0,013
Bœuf	9,75	0,613
Génisse	8,46	0,418
Moyenne	10,23	0,72

2. — SÉPARATION PAR DIALYSE DE LA SOLUTION
DES PROTÉINES APRÈS ÉLIMINATION DE LA GLOBULINE
PAR FLOCCULATION AUX ACIDES.

*Myxoprotéine totale desséchée sur vide sulfurique
par litre de sérum.*

Sérums normaux (les mêmes que plus haut)	En gr.
Bœuf	6,762
Taureau	9,710
Vache	8,314
Cheval	6,386
Moyenne	7,793

Nous laissons de côté provisoirement les deux procédés de dialyse et d'électrodialyse effectués directement sur la solution totale des protéines puisqu'elles conduisent toutes deux à des mélanges de globuline et de myxoprotéine mais, appliquée après élimination de la globuline, l'électrodialyse nous paraît devoir donner des résultats intéressants.

Origine de la Myxoprotéine.

Une question se pose tout naturellement : quelle est l'origine de cette substance ?

Nous répondrons en deux mots que pour Piettre « la myxoprotéine provient des mêmes sources que la sérum-globuline et la sérumalbumine ; ces protéines résultent de l'activité cellulaire, d'une véritable sécrétion endocrinienne, au même titre que les ferments, les hormones etc. C'est là un chapitre tout nouveau de la physiologie pure que Piettre a abordé par les méthodes de chimie d'abord puis de la physico-chimie ensuite, dès qu'il a eu en mains une technique certaine de la préparation de la myxoprotéine et surtout lorsqu'il a puretrouver une substance analogue dans d'autres liquides biologiques que le sérum du sang, sans avoir recours cette fois à l'emploi de solvants (acétone ou alcool).

CHAPITRE II

ÉTUDE CHIMIQUE DE LA MYXOPROTÉINE

I. — Propriétés physiques.

a) *A l'état frais.* — La myxoprotéine se présente au moment de sa précipitation, tantôt sous forme de flocons grisâtres s'agglomérant rapidement en un dépôt visqueux, tantôt sous l'aspect d'un très fin précipité brunâtre (myxoprotéine de 2^e précipitation) restant assez longtemps en suspension avant de se déposer.

Une fois agglomérée, comme certains colloïdes, elle possède la propriété de se contracter, de se rétracter et d'exsuder un liquide parfaitement limpide : c'est le phénomène bien connu de la « synérèse ».

A ce titre, elle présente une différence tout à fait caractéristique avec la globuline dont les flocons sont blancs, grenus, fins et surtout avec la sérum-albumine, colloïde d'une très grande solubilité dans l'eau.

Sa couleur varie suivant les espèces animales : blonde, jaunâtre ou grisâtre chez le bœuf et le cheval, de teinte un peu plus foncée chez le taureau, le plus souvent légèrement bleuâtre chez l'homme. C'est cette nuance qui déjà avait frappé Hardy au cours de ses recherches sur les protéines du sang de l'homme et lui avait fait penser à l'existence possible d'une substance spéciale.

Le mode de préparation lui-même peut faire varier légèrement la coloration de cette substance suivant qu'il favo-

rise plus ou moins la fixation des pigments présents dans le le sérum. Peu visible quand il y a adsorption de pigments jaunes d'origine biliaire, la coloration devient manifeste, légèrement verdâtre ou bleuâtre quand il s'agit d'ictère déjà ancien. Cette observation a été faite maintes fois par M. Piettre dans le traitement des sérums d'ictériques qui ont été adressés au Laboratoire des Halles par le professeur Achard ou ses collaborateurs de l'Hôpital Cochin : les D^{rs} Debray, Hamburger, Moussion et par M. Arcand.

La myxoprotéine de première précipitation est en général d'un teint plus foncé parce qu'elle adsorbe plus abondamment les pigments tandis que les derniers fractionnements sont obtenus dans les liqueurs de moins en moins riches en substances colorantes. Elle fixe avec une grande facilité l'hémoglobine des sérums légèrement hémolysés.

Quand elle est souillée de globuline son aspect est plus grenu, sa coloration plus blanchâtre, en même temps elle se dépose plus lentement et d'une façon plus incomplète, sa rétraction est moins nette.

b) *A l'état sec.* — La matière desséchée sur vide sulfurique se présente en belles paillettes conservant la coloration primitive, et se laissant pulvériser facilement en une poudre blanche rappelant la farine.

ACTION DES AGENTS PHYSIQUES ET CHIMIQUES. — 1^o *De la chaleur et des sels.* — Chauffée la myxoprotéine se boursoffle en répandant une odeur de corne brûlée très vive puis elle noircit et se carbonise sans laisser traces de cendres appréciables.

Les sols de myxoprotéine coagulent mal à la chaleur en un liquide opalescent d'aspect vitreux. L'addition d'électrolytes provoque rapidement la formation de gros flocons qui adhèrent au verre ou se déposent s'ils sont en très faible quantité:

Dispersée dans les sels neutres et peptisée dans une solu-

tion de NaCl à 8 gr. 5 ‰, la myxoprotéine donne un louche laiteux dès 57-60° suivant la concentration qui, vers 65-67° se résout en un volumineux floculat. Il faut aller jusque vers 70-75° pour avoir une coagulation à peu près complète.

2° *Acides*. — D'une façon générale, les acides en solution étendue, HCl, SO^4H^2 , acétique, etc. la dissolvent en donnant des liqueurs limpides.

Par contre, l'acide sulfosalicylique à 5 ‰ précipite la myxoprotéine mais plus difficilement la globuline. Fait intéressant : les solutions de sérum-albumine ne sont pas floculées par l'acide sulfosalicylique mais il se produit un louche qui reste stable.

3° *Bases*. — La soude, la potasse, l'ammoniaque dissolvent la myxoprotéine en toutes proportions et donnent des liqueurs à peu près limpides.

Il semble préférable de se servir de l'ammoniaque en liqueur très étendue $\frac{\text{N}}{100}$ ou $\frac{\text{N}}{200}$ pour disperser la myxoprotéine, d'abord en raison du très faible coefficient d'ionisation de NH^3 dans l'eau, ensuite parce que son élimination peut être faite complètement par séchage sur vide alors que la dialyse est nécessaire pour les autres bases alcalines non volatiles.

4° *Sels neutres*. — La myxoprotéine est nettement soluble dans les solutions d'électrolytes neutres : NaCl, KCl, KBr, KI, SO^4Na^2 , NO^3K , $\text{PO}^4\text{Na}^2\text{H}$, etc... Ces solutions sont limpides grâce à l'action peptisante de ces sels.

La solubilité dans l'eau pure est très faible environ 1 gr. ‰ pour les premières fractions ; elle diminue beaucoup pour les dernières fractions 0,230 ‰ en moyenne.

Les solutions aqueuses de myxoprotéine possèdent les caractères essentiels des colloïdes ; en particulier elles présentent nettement le phénomène de Tyndall et ne dialysent pas.

Etude de la solubilité de la myxoprotéine.

1. — SOLUBILITÉ DANS L'EAU.

PRINCIPE. — La solubilité dans l'eau a été étudiée à partir de la myxoprotéine humide telle qu'elle est séparée par le traitement acétonique.

Après isolement par centrifugation on la lave 4 à 5 fois largement et en agitant à plusieurs reprises.

La substance bien égouttée est alors soumise à des épuisements successifs avec des volumes d'eau distillée suffisants pour que l'on puisse obtenir par agitation vive une très fine suspension qui n'a du reste qu'une durée précaire, une agglomération des flocculats amenant un dépôt rapide. On prélève, suivant la technique utilisée autrefois par Etard pour l'étude des solubilités des sels minéraux, des volumes donnés, à l'aide de pipettes à 2 traits, dont la pointe est garnie préalablement d'ouate permettant, par une véritable filtration, d'obtenir des liqueurs aussi claires que possible. Après avoir enlevé le tampon d'ouate on laisse écouler un volume exactement mesuré, dans un vase taré.

Après évaporation de l'eau au bain-marie on achève la dessiccation à poids constant à 105-107°.

Voici les résultats obtenus en partant des myxoprotéines isolées de sérum de bœuf, de vache et de taureau.

EXPÉRIENCE I.

(Sérum de bœuf.)

Solubilité des différentes fractions de myxoprotéine isolées par précipitation acétonique de 150 cm³ de sérum de bœuf.

Myxoprotéine de première précipitation.

Volume d'eau employé	Poids de résidu correspondant	Résidu rapporté à 100 cm ³ d'eau
1 ^{re} eau d'extraction V = 40 cm ³	0 gr. 0263	0 gr. 0660
2 ^e — V = 30 cm ³	0 gr. 0412	0 gr. 1373
3 ^e — V = 48 cm ³	0 gr. 0455	0 gr. 0947
4 ^e — V = 58 cm ³	0 gr. 0393	0 gr. 0677
Moyenne : 0 gr. 09142 %.		
Soit : 0 gr. 9142 par litre.		

Myxoprotéine de deuxième précipitation.

Volumes d'eau employés	Poids de résidu correspondant	Résidu rapporté à 100 cm ³ d'eau
Les 3 eaux d'extract. réunies V = 83 cm ³	0 gr. 0090	0 gr. 0136
Soit : 0 gr. 136 par litre.		

EXPÉRIENCE II.

(Sérum de vache.)

Myxoprotéine de première précipitation.

1 ^{re} eau d'extraction V = 62 cm ³	0 gr. 0532	0 gr. 0841
2 ^e — V = 80 cm ³	0 gr. 0783	0 gr. 0978
3 ^e — V = 67 cm ³	0 gr. 0584	0 gr. 0871
4 ^e — V = 60 cm ³	0 gr. 0265	0 gr. 0441
Moyenne % : 0 gr. 0782.		
Soit : 0 gr. 782 par litre.		

Myxoprotéine de deuxième précipitation.

Volumes d'eau employés	Poids du résidu correspondant	Résidu rapporté à 100 cm ³ d'eau
Les 3 eaux d'extraction réunies V = 87 cm ³	0 gr. 0312	0 gr. 0358
Soit : 0 gr. 358 par litre.		

EXPÉRIENCE III.

(Sérum de bœuf.)

Myxoprotéine de première précipitation.

Volumes d'eau employés		Poids du résidu correspondant	Résidu rapporté à 100 cm ³ d'eau
1 ^{re} eau d'extraction	V = 50 cm ³	0 gr. 0364	0 gr. 0724
2 ^e —	V = 47 cm ³	0 gr. 0831	0 gr. 1768
3 ^e —	V = 60 cm ³	0 gr. 0478	0 gr. 0796
4 ^e —	V = 45 cm ³	0 gr. 0197	0 gr. 0437
Moyenne % : 0 gr. 0931.			
Soit : 0 gr. 931 par litre.			

Myxoprotéine de deuxième précipitation.

1 ^{re} eau d'extraction	V = 44 cm ³	0 gr. 0021	0 gr. 0477
2 ^e —	V = 45 cm ³	0 gr. 0058	0 gr. 0128
Moyenne : % = 0 gr. 0302.			
Soit : 0 gr. 302 par litre.			

EXPÉRIENCE IV.

(Sérum de taureau.)

Myxoprotéine de première précipitation.

Volumes d'eau employés		Poids du résidu correspondant	Résidu rapporté à 100 cm ³ d'eau
1 ^{re} eau d'extraction	V = 60 cm ³	0 gr. 0821	0 gr. 1368
2 ^e —	V = 54 cm ³	0 gr. 0748	0 gr. 1385
3 ^e —	V = 48 cm ³	0 gr. 0591	0 gr. 1231
4 ^e —	V = 70 cm ³	0 gr. 0314	0 gr. 0448

Les moyennes de solubilité dans l'eau dans ces quatre expériences sont donc les suivantes :

Myxoprotéine de première précipitation : 0 gr. 933 %, sensiblement 1^o/₁₀₀.

Myxoprotéine de deuxième précipitation : 0 gr. 229 ^o/₁₀₀.

On voit d'une façon générale que la myxoprotéine de première précipitation est nettement plus soluble que les fractions ultérieures bien que ces fractions paraissent par leur aspect plus fluide, se rapprocher davantage de la sérum-albumine.

Les chiffres obtenus ne nous paraissent d'ailleurs représenter que de simples approximations. On ne saurait en effet, appliquer aux colloïdes les mêmes règles qu'aux cristalloïdes.

Les cristalloïdes donnent, comme on le sait, de véritables dissolutions moléculaires. En ce qui concerne les suspensions colloïdales il n'existe pas au contraire de discontinuité nette entre le corps dissous et le solvant surtout quand le premier est un colloïde lyophile où les micelles n'ont pas toutes la même taille. A chaque grosseur de la micelle doit correspondre théoriquement un pouvoir spécial de fixation d'eau par hydratation ou par immobilisation physique (polarisation).

La notion de solubilité vraie pourrait être cependant admise pour certains colloïdes ayant une grosseur granulaire sensiblement uniforme comme l'hémoglobine et la sérum-albumine (M. Piettre).

Cette dernière particularité explique également que ces deux protéines cristallisent admirablement. C'est là un nouveau pont entre les cristalloïdes et les colloïdes.

En résumé ces expériences de solubilité de la myxoprotéine n'ont pas d'autre valeur, que de fixer l'ordre de grandeur de cette propriété.

2. — SOLUBILITÉ DANS LES ÉLECTROLYTES NEUTRES.

On part ici de myxoprotéine lavée, séchée sur vide sulfurique. Après pulvérisation extrêmement fine, la matière est mise au contact d'une solution d'électrolyte de concentration connue.

On laisse la saturation se faire et on prélève, par la technique d'Etard, des volumes donnés de liqueurs aussi claires que possible.

Dans nos expériences on pèse 1 gr. de myxoprotéine bien pulvérisée que l'on fait tomber dans 40 cm³ de solution d'un électrolyte. On agite de temps en temps en vase couvert pour éviter l'évaporation. Après 3 à 4 heures on prélève à l'aide d'une pipette de précision 4 cm³ de liquide surnageant en ayant soin comme plus haut de protéger l'extrémité de la pipette à l'aide d'un tampon de coton hydrophile pour éviter l'entraînement des particules de matière non dispersée.

On évapore le liquide prélevé d'abord au bain-marie puis à l'étuve à 105-107° et on pèse à poids constant.

Les solubilités à différentes températures étaient réalisées au thermostat.

(EXPÉRIENCE I.

(*Myxoprotéine de bœuf*).

Solution de NaCl $\frac{N}{10}$.

Température = 11° (température du laboratoire).

Prélèvement sur 4 cm³, sec obtenu : 0 gr. 0796.

Soit : $0,0796 \times 20 = 1$ gr. 99 %.

Soit ‰ : 19 gr. 9.

Soit après défalcation : 5 gr. 85 de NaCl : 19 gr. 9 — 5 gr. 85 = 14 gr. 05 ‰.

T. = 26°.

Prélèvement sur 4 cm³, sec obtenu : 0 gr. 1013.

Soit : $0,1013 \times 25 = 2,5325$ %.

Soit ‰ : 25 gr. 325.

Soit après défalcation de 5 gr. 85 de NaCl : 25 gr. 325 — 5 gr. 85 = 19 gr. 475 ‰.

T. = 36°.

Prélèvement sur 4 cm³, sec obtenu : 0 gr. 1947.

Soit : $0,1947 \times 25 = 4$ gr. 8675 %.

Soit ‰ : 48 gr. 675.

Soit après défalcation de 5 gr. 85 de NaCl : 48 gr. 675 — gr. 855 = 42 gr. 825 ‰.

EXPÉRIENCE II.

Solution de NaCl $\frac{N}{100}$.

Température = 9° (température du laboratoire).

Prélèvement sur 4 cm³, sec obtenu : 0 gr. 0138.

Soit : 0 gr. 0138 $\times$ 25 = 0 gr. 345 %.

Soit ‰ : 3 gr. 45.

Soit après défalcation de 0 gr. 585 de NaCl : 3 gr. 45 — 0 gr. 585 = 2 gr. 865 ‰.

T. = 26°.

Prélèvement sur 4 cm³, sec obtenu : 0 gr. 0145.

Soit : 0,0145 $\times$ 25 = 0 gr. 3625 %.

Soit ‰ : 3 gr. 625.

Soit après défalcation : 3 gr. 625 — 0 gr. 585 = 3 gr. 040 ‰.

T. = 36°.

Prélèvement sur 4 cm³, sec obtenu : 0 gr. 0333.

Soit % : 0 gr. 8325.

Soit ‰ : 8 gr. 325.

Soit après défalcation : 8 gr. 325 — 0 gr. 585 = 7 gr. 74 ‰.

EXPÉRIENCE III.

Solution de KCl $\frac{N}{100}$.

Température = 11° (température du laboratoire).

Prélèvement sur 4 cm³. Résidu obtenu : 0 gr. 0137.

Soit : 0,137 $\times$ 25 = 0 gr. 3425 %.

Soit ‰ : 3 gr. 425.

Soit après défalcation de 0 gr. 746 de KCl : 3 gr. 425 — 0 gr. 746 = 2 gr. 579 ‰.

T. = 25°.

Prélèvement sur 4 cm³. Résidu obtenu : 0 gr. 0143.

Soit % : 0 gr. 3575.

Soit ‰ : 3 gr. 575.

Soit après défalcation de 0 gr. 746 de KCl : 3 gr. 575 — 0 gr. 746 = 2 gr. 829 ‰.

T. = 37°.

Prélèvement sur 4 cm³. Résidu obtenu : 0 gr. 0312.

Soit 0 gr. 78 % ou 7 gr. 8 ‰.

Soit après défalcation : 7 gr. 8 — 0 gr. 746 = 7 gr. 054 ‰.

EXPÉRIENCE IV.

Solution de $\text{SO}^2\text{Na}^4 \frac{\text{N}}{100}$.

Température = 9°.

Prélèvement sur 4 cm³. Résidu obtenu : 0 gr. 0241.

Soit : $0,0241 \times 25 = 0$ gr. 6025 %.

Soit : 6 gr. 025 ‰.

Soit après défalcation de 1 gr. 420 de SO^4Na^2 : 6 gr. 025 — 1 gr. 420 = 4 gr. 605 ‰.

T. = 26°.

Prélèvement sur 4 cm³. Résidu obtenu : 0 gr. 0382.

Soit : $0,0382 \times 25 = 0$ gr. 955 %.

Soit : 9 gr. 55 ‰.

Soit après défalcation : 9,55 — 1,420 = 8 gr. 13 ‰.

T. = 36°.

Prélèvement sur 4 cm³. Résidu obtenu : 0 gr. 050.

Soit : $0,050 \times 25 = 1$ gr. 25 %.

Soit : 12 gr. 5 ‰.

Soit après défalcation : 12,5 — 1,420 = 11 gr. 08 ‰.

Ces expériences sont certes très insuffisantes et une étude systématique des divers électrolytes est indispensable ; nous nous réservons de la compléter plus tard.

Des résultats obtenus nous pouvons cependant tirer quelques indications utiles en ce qui concerne NaCl, KCl et SO^4Na^2 :

1° La solubilité varie avec les sels employés (1) ; elle est relativement plus grande pour le sulfate de soude que pour

1. M. Piettre et A. Guilbert C. R., p. 283 (1932), étudiant la dispersion de la myxoprotéine dans les solutions de NaCl, ont montré qu'elle ne trouve pas son explication dans une adsorption du sel de cette protéine.

le chlorure de sodium et le chlorure de potassium à égales concentrations.

2° Dans tous les cas la solubilité varie très nettement avec la température et avec la concentration du solvant.

II. — Propriétés chimiques.

RÉACTIONS GÉNÉRALES DES PROTÉIDES.

Nous avons appliqué les réactions générales des protides à l'étude de la myxoprotéine.

Voici les résultats obtenus en partant d'un hydrosol à 0 gr. 1 % de myxoprotéine de bœuf préalablement desséchée sur vide sulfurique.

A. — Réactions colorées.

1° *Réaction xanthoprotéique* : à 5 cm³ d'hydrosol de myxoprotéine on ajoute un égal volume d'acide nitrique. Le mélange prend à l'ébullition une coloration jaune.

Sur le résidu de l'évaporation du mélange on ajoute NaOH en excès et obtient une coloration rouge orangé.

2° *Réaction de Millon*. — L'addition à volume égal (5 cm³) provoque à l'ébullition la formation d'un coagulum d'abord blanc qui se colore rapidement en rouge brique indiquant l'existence, dans la molécule de myxoprotéine, d'une fonction phénolique, plus particulièrement la tyrosine.

3° *Réaction du biuret*. — A 5 cm³ d'hydrosol de myxoprotéine on ajoute 10 cm³ de lessive de soude puis quelques gouttes d'une solution à 1 % de sulfate de cuivre on observe une belle coloration violette.

4° *Réaction de la cystine*. — 5 cm³ d'hydrosol de myxoprotéine additionnés de 10 cm³ de lessive de soude et

quelques gouttes de sous-acétate de plomb, donnent à l'ébullition une coloration noire.

5^o *Réaction de Caventou*. — 10 cm³ de HCl pur et concentré ajoutés à 5 cm³ d'hydrosol de myxoprotéine donnent après une demi-heure d'ébullition au bain-marie une belle coloration violette.

6^o *Réaction de Hopkins* (Réaction glyoxylique). — Après avoir ajouté à 5 cm³ d'hydrosol de myxoprotéine V gouttes d'une solution d'acide glyoxylique on fait tomber lentement au moyen d'une pipette plongée au fond du tube à essai de l'acide sulfurique concentré (32^o Baumé) on observe une belle coloration violette.

B. — Réactions de précipitation.

1^o Les acides minéraux forts : HCl SO⁴H² NO³H ne précipitent pas la myxoprotéine.

2^o Les acides organiques tels que l'acide trichloracétique et l'acide sulfosalicylique précipitent cette substance.

L'acide acétique par contre la dissout en toutes proportions en donnant des liqueurs visqueuses pour les fortes concentrations en substance sèche.

La précipitation par l'acide sulfosalicylique est particulièrement intéressante : une solution de cet acide à 0 gr. 5 ‰ donne avec la myxoprotéine un beau précipité blanc mais précipite incomplètement la sérum-globuline. L'addition aux solutions de sérum-albumine provoque à peine un louche très faible.

Les diverses fractions de myxoprotéine se conduisent de la même façon vis-à-vis des réactifs généraux des protides.

Indiquons en passant une réaction spécifique signalée par M. Piettre pour la sérum-albumine : la *floculation de cette protéine par les solutions de résorcine* qu'il étudie actuellement par les méthodes physico-chimiques.

III. — Composition élémentaire.

Nous donnons les résultats de quelques analyses qui nous ont été communiqués par M. Piettre.

Elles ont porté sur des échantillons moyens de myxoprotéine de sérum de bœuf. La matière d'abord séchée sur vide sulfurique est chaque fois pulvérisée, puis portée à 105°-107° jusqu'à poids aussi constant que possible. Il est en effet de grande importance pour les raisons indiquées plus haut (p. 60) de bien fixer la température à laquelle on sèche les protéines si l'on veut obtenir des résultats comparables.

COMPOSITION CENTÉSIMALE.

Dosage du carbone et de l'hydrogène.

Première analyse. — Poids de matière utilisée : 0 gr. 2650.

Eau pesée	= 0 gr. 1674	H % = 7,075
CO ²	= 0 gr. 4519	C % = 46,507

Deuxième analyse. — Faite sur 0 gr. 1860 de matière.

Eau pesée	= 0 gr. 1210	H % = 7,28
CO ²	= 0 gr. 3177	C % = 46,58

Dosage de l'azote.

Il a été fait par la méthode de Kjeldhal et contrôlé par la méthode de Dumas. La teneur moyenne = 14,35 %.

Voici comparativement les teneurs en azote par microkjeldhal (technique de M. Boivin) pour les différentes protéines séparées par la méthode à l'acétone et provenant d'un même sérum de bœuf :

	Poids de matières en mgr.	N	N %	Moyenne
Sérum albumine :	15,172	2,41	15,9	15,86
	12,973	2,06	15,9	
	15,065	2,38	15,8	
Sérum globuline :	13,814	1,93	14,0	14,1
	13,678	1,96	14,8	
	11,050	1,55	14,0	
Myxoprotéine de première précipitation :	11,584	1,72	14,8	14,6
	11,451	1,65	14,6	
	13,464	1,92	14,6	
Myxoprotéine de deuxième et troisième précipitations réunies :	12,672	1,815	14,3	14,33
	11,525	1,70	14,7	
	11,343	1,62	14,3	

Dosage du soufre.

Le dosage du soufre effectué par différentes techniques a donné 1,1 % en moyenne (cheval).

Pour la sérum-globuline la moyenne est : 0,80 %.

Pour la sérum-albumine la moyenne est : 2,3 %.

Dosage du phosphore.

Il s'agit ici de phosphore organique dû à la présence de traces de lipides phosphorées et impuretés qui, seules peuvent être enlevées au Kumagava comme l'a montré Arcand.

Le dosage fait par la méthode de Pregl a donné pour les mêmes échantillons que plus haut :

	Matière en mgr.	P	P %
Myxoprotéine de 1 ^{re} précipitation	13,233	0,025	0,190
2 ^e et 3 ^e précipitations	16,242	0,015	0,09

L'ensemble de ces analyses permet de se faire déjà une bonne idée de la composition moyenne de la myxoprotéine du sérum sanguin.

CHAPITRE III

MÉTHODES PHYSIQUES APPLIQUÉES A L'ÉTUDE DES PROTÉINES ET EN PARTICULIER A LA « MYXOPROTÉINE »

Nous avons cru utile de compléter l'étude chimique de la myxoprotéine, substance colloïdale, par une étude physico-chimique.

Ces recherches ont eu pour point de départ les observations de Pieltre, sur une curieuse modification de la myxoprotéine observée au froid, à la congélation. La masse d'abord incolore vire bientôt au rose assez vif. Il a pensé que ce virage pouvait correspondre à des modifications intimes de la matière rendues plus manifestes par l'action du froid et que seules les méthodes de la colloïdologie permettrait d'étudier.

Nous adressons ici à M. A. Boutaric et à ses collaborateurs en particulier, M. Maurice Doladilhe son chef de Travaux, nos vifs remerciements de l'accueil bienveillant qu'ils nous ont réservé au laboratoire de chimie physique à la Faculté des Sciences de Dijon, et des conseils qu'ils nous ont prodigués pour mener à bien cette partie de notre travail.

Nos recherches ont porté principalement sur les points suivants : floculation, viscosité, facteur ω , électrophorèse et fixation des matières colorantes.

I. — Etude de la floculation.

CHOIX D'UNE MÉTHODE D'ÉTUDE.

Les méthodes utilisées pour l'étude de la floculation des solutions colloïdales sont fort nombreuses :

a) Les unes *directes* consistent à mesurer au moyen d'un ultramicroscope le nombre de grains contenus dans un volume donné de la solution, pendant la floculation (1).

b) Les autres *indirectes* sont basées sur un changement temporaire d'une propriété physico-chimique : viscosité, coloration, opacité.

Parmi les méthodes qui sont basées sur les variations de l'opacité citons celles qui consistent :

1^o à déterminer la plus faible quantité d'électrolyte nécessaire pour produire la floculation au bout d'un temps suffisant.

2^o à mesurer la durée de la floculation produite par des concentrations données de l'électrolyte ;

3^o à déterminer la plus faible quantité d'électrolyte pour provoquer une floculation immédiate (2) ;

4^o ou enfin la quantité d'électrolyte qui détermine la floculation en un temps déterminé (2) ;

Les résultats fournis par ces différentes méthodes ne sont pas toujours comparables.

La floculation qui est en somme la séparation des granules est un phénomène très complexe. Il est impossible de situer par l'observation à l'œil nu à quel moment elle débute. Il faudrait pour cela suivre pas à pas le grossissement granulaire afin de noter l'instant à partir duquel ce grossissement ayant atteint son maximum, les granules sont passées à l'état de floculats. C'est ce que permet de

1. Zsigmondy, *Z. f. physik. chimie*, 92, 600 et 750 à 762, 1918.

2. W. Oswald, *Manipulation de Chimie colloïdale*. Librairie Gauthier-Villars, 1924, p. 149-151.

faire la méthode de mesure imaginée et mise au point par M. Boutaric que nous avons utilisée et dont nous donnons ci-dessous le principe.

EXPOSÉ DE LA MÉTHODE BOUTARIC.

Principe. — Lorsqu'on introduit dans une solution colloïdale un électrolyte en quantité suffisante, on observe une augmentation progressive de l'opacité du mélange dû à un grossissement des micelles.

La méthode consiste à suivre les variations de cette opacité et à en mesurer la durée, pour une radiation déterminée, au moyen d'un photomètre ou mieux d'un spectrophotomètre, celui de Féry par exemple.

a) On intercale, sur le trajet de l'un des faisceaux du spectrophotomètre une cuve à faces parallèles contenant la solution colloïdale diluée de moitié avec de l'eau distillée. On rétablit l'égalité des deux plages pour les deux faisceaux dans une région appropriée du spectre et on note la position (x_0) du prisme absorbant.

b) On dispose alors sur le même faisceau de l'appareil une cuve identique contenant la même solution colloïdale diluée dans un égal volume d'une solution d'un électrolyte de concentration convenable. L'opacité de la solution augmente. On rétablit comme précédemment l'égalité des plages et note la position (x) du prisme absorbant à un instant quelconque (t).

Le coefficient d'absorption lumineuse dû à la modification réalisée dans la solution à l'instant t par la présence de l'électrolyte est proportionnel à $x - x_0$.

L'opacité $x - x_0$ augmente avec le temps d'abord rapidement puis de moins en moins vite et tend vers une limite.

Lorsque cette limite est atteinte la solution colloïdale devient tout à fait instable et floccule sous une très légère

influence physique par exemple par simple agitation. Toutefois si on évite toute agitation la solution peut se conserver longtemps dans cet état sans flocculer.

La mesure de l'intervalle de temps que met l'opacité à atteindre sa valeur limite, permet donc de déterminer avec précision la durée de floculation d'une solution colloïdale sous l'influence d'un électrolyte introduit en quantité convenable.

Appareil employé. — Nous nous sommes servi du photomètre Bricq-Yvon et les mesures ont été effectuées en lumière rouge (écran Wratten α).

Mode opératoire. — *Préparation des mélanges colloïdes électrolytes :* Les mélanges colloïdes-électrolytes ont été effectués de la façon suivante :

A un volume V , du sol colloïdal on ajoute un égal volume V d'une solution électrolytique. En faisant varier les concentrations de l'électrolyte ou du colloïde on peut réaliser des mélanges contenant toutes les proportions désirées de chaque constituant.

Nous avons adopté dans nos expériences $V = 6 \text{ cm}^3$
 $V' = 6 \text{ cm}^3$. Ces volumes ont été mesurés au moyen d'une burette graduée au $\frac{1}{10}$ de cm^3 .

Lecture photométrique. — Le photomètre étant préalablement réglé de façon à donner, pour l'eau, une densité optique $h = 0$ on mesure :

1^o la densité optique h , de la solution colloïdale additionnée de son volume d'eau distillée ;

2^o la densité optique h du mélange de colloïde et d'électrolyte, cette dernière mesure est effectuée à intervalles de temps croissants.

Nous avons vu en effet que, si la solution électrolytique a une concentration convenable, le colloïde est le siège d'une évolution et la densité optique va en augmentant

avec le temps, finit par atteindre une limite après quoi le sol devient instable.

On suit donc cette évolution en fonction du temps (donné par un chronomètre) en notant chaque fois les divisions photométriques et en ayant soin de rétablir, avant chaque lecture, l'égalité des deux plages de la lunette.

On est averti que la limite de l'opacité ou densité optique limite est atteinte lorsque, après plusieurs lectures, on trouve le même nombre de divisions photométriques (à une ou deux divisions près pour un observateur exercé). Il est facile pour s'en assurer d'enlever la cuve, de lui imprimer une légère secousse et de l'examiner à l'œil nu. On voit alors apparaître de petits flocons qui grossissent peu à peu et finissent par se déposer.

La mesure terminée, il suffit de construire la courbe $t = f(h)$ pour avoir la durée de floculation de la solution colloïdale étudiée.

Cette durée étant éminemment variable avec la concentration sous laquelle l'électrolyte est introduit et avec la manière d'introduire cet électrolyte, il est nécessaire, pour avoir des résultats précis et comparables, *d'opérer toujours dans les mêmes conditions* :

Non seulement il faut que le mélange final colloïde-électrolyte possède *un volume total déterminé et contienne des masses déterminées de colloïde et d'électrolyte*, mais aussi que ce mélange soit effectué *toujours de la même manière* en versant la solution électrolytique dans le sol colloïdal.

Ajoutons qu'il est préférable de se servir de la même cuve dans toutes les expériences et de la placer dans le photomètre de façon qu'une de ses faces soit tournée constamment dans la même direction.

Cette méthode présente de grands avantages.

Tout d'abord le temps que met le colloïde à atteindre la valeur limite de l'opacité est parfaitement défini. Plusieurs expériences faites dans les mêmes conditions (en

prenant les précautions indiquées) fournissent exactement les mêmes valeurs pour cette durée. On peut donc mesurer avec précision la durée de floculation.

Ce procédé permet en outre d'évaluer la stabilité d'une solution colloïdale vis-à-vis d'un électrolyte donné avec autant de rigueur.

En effet, si on mesure les durées de floculation d'un sol colloïdal dans les conditions indiquées précédemment, par des électrolytes de concentrations décroissantes, et si on construit ensuite la courbe $t = f(c)$ en portant en ordonnées les temps et en abscisses les concentrations, on remarque qu'elle présente une asymptote parallèle à l'axe des temps. La concentration de l'électrolyte qui correspond à l'asymptote représente justement la dose maxima d'électrolyte que la solution colloïdale puisse supporter sans flocculer, c'est-à-dire la stabilité de cette solution vis-à-vis de l'électrolyte employé.

M. le professeur Boutaric a d'ailleurs imaginé deux méthodes permettant de calculer cette concentration limite, méthode qu'il serait trop long d'exposer ici.

APPLICATION A L'ÉTUDE DE LA FLOCULATION DE LA MYXOPROTÉINE.

Préparation des sols de myxoprotéine. — Des échantillons moyens de myxoprotéine de bœuf, préalablement purifiés soigneusement par de nombreux lavages puis desséchés sur vide sulfurique, sont broyés finement au mortier puis mis en suspension dans de l'eau distillée.

Après 24 heures de contact et de fréquentes agitations on centrifuge ou on filtre et on obtient ainsi un liquide légèrement opalescent. En suspension dans les électrolytes ces sols sont presque limpides.

Les hydrosols de myxoprotéine sur lesquels ont porté nos expériences sont à 0,1 %.

1. — Flocculation par les électrolytes.

Si on ajoute à une même quantité de myxoprotéine des quantités croissantes de divers électrolytes on obtient des résultats différents suivant la nature de l'électrolyte.

D'une façon générale : 1° on n'observe *aucune flocculation* quelle que soit la dose d'électrolyte introduite lorsque ce dernier est à *anion polyvalent* ou à *anion et cation monovalents*. Il en est de même lorsque l'*anion monovalent est allié à un cation divalent*.

2° au contraire lorsque *le cation est tri ou tétravalent* ou lorsque l'électrolyte est *un acide fort* on observe une flocculation pour *certaines concentrations* en électrolyte.

C'est ce que montrent les résultats résumés dans le tableau suivant :

ESSAIS DE FLOCCULATION SUR 10 CM³ D'HYDROSOL DE MYXOPROTÉINE A 0,1 %.

I. — *Electrolytes à cation monovalent et anion mono et polyvalent.*

Les liqueurs suivantes :

	$\frac{N}{10}$	$\frac{N}{100}$	$\frac{N}{200}$	$\frac{N}{500}$
NaCl	$\frac{N}{10}$	$\frac{N}{100}$	$\frac{N}{200}$	$\frac{N}{500}$
KCl	—	—	—	—
LiCl	—	—	—	—
So ⁴ Na ²	—	—	—	—
Po ⁴ NaH ²	—	—	—	—

ajoutées, même à *doses massives*, à 10 cm³ de myxoprotéine chaque fois ne provoquent *aucune flocculation*.

II. — *Electrolytes à cation polyvalent et à anion monovalent.*

α) *Cation bivalent* : Les solutions de :

BaCl ²	$\frac{N}{10}$	$\frac{N}{100}$	$\frac{N}{500}$	$\frac{N}{1000}$
CaCl ²	—	—	—	—
SrCl ²	—	—	—	—

ne donnent également lieu à *aucune floculation*.

β) *Cation trivalent AlCl³*. — Avec 0 cm³ 2 de solution AlCl³ à $\frac{N}{10}$ $\frac{N}{100}$ $\frac{N}{500}$ $\frac{N}{1000}$ on observe un éclaircissement progressif du sol de myxoprotéine correspondant à une peptisation.

La même dose d'une solution de AlCl³ à $\frac{N}{2000}$ *fait flo-culer* 10 cm³ du sol de myxoprotéine.

γ) *Cation tétravalent ThCl⁴*. — Avec 0 cm³ 5 de solution de ThCl⁴ à $\frac{N}{10}$ $\frac{N}{100}$ $\frac{N}{1000}$ $\frac{N}{2000}$ $\frac{N}{5000}$ le résultat est également une peptisation.

La même quantité 0 cm³ 5 d'une solution de ThCl⁴ à $\frac{N}{10000}$ *provoque une floculation très nette*.

III. — *Electrolytes divers.*

Pour 10 cm³ d'un hydrosol de myxoprotéine l'addition, soit de : 0 cm³ 2 HCl $\frac{N}{100}$, soit de 2 cm³ d'une solution d'acide sulfosalicylique à 0,5 ‰ *provoque une floculation nette*.

CONCLUSION. — De ces expériences se dégagent les conclusions suivantes :

1^o Les électrolytes à cation mono et divalent même employés à des doses massives ne font pas flocculer les sols de myxoprotéine.

2^o Seuls les électrolytes forts à cation tri et tétravalent et les acides provoquent une floculation nette.

En d'autres termes, la floculation de la myxoprotéine dépend uniquement *de la valence du cation de l'électrolyte* ce qui indique que le colloïde doit posséder d'après la loi de Hardy, une charge négative. L'étude de l'électrophorèse nous a montré en effet, que les particules de myxoprotéine se déplacent vers l'anode.

Si l'on convient de ranger dans le groupe des colloïdes lyophiles ceux qui ne flocculent que sous des doses massives d'électrolytes contrairement aux colloïdes lyophobes plus instables, la myxoprotéine représenterait une catégorie de lyophiles particulièrement stables, nettement plus stables que la sérum-globuline et même que la sérum-albumine. Peut-être en est-il de même dans le sérum sanguin qui conserve, malgré l'introduction journalière de grosses quantités d'électrolytes, une remarquable stabilité.

Dans les cas où on observe une floculation nous avons étudié par la méthode exposée plus haut les variations de la densité optique des mélanges de sol de myxoprotéine et d'électrolytes flocculants, ces derniers étant employés sous des concentrations croissantes.

Voici une série de résultats obtenus :

EXPÉRIENCE I.

(Hydrosol de myxoprotéine de bœuf nivernais à 0,1 %.)

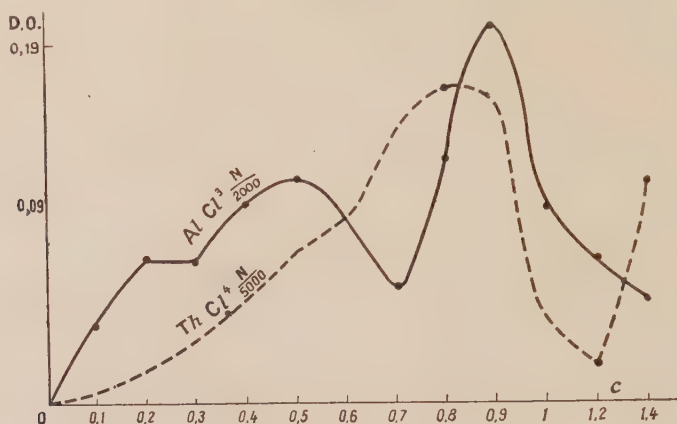
a) Flocculation par AlCl_3 $\frac{\text{N}}{2000}$

Concentration en AlCl_3 $\frac{\text{N}}{2000}$	Densités optiques	Résultats (au bout de 2 heures)
0,1	0,04	Absence de flocculation
0,2	0,06	Absence de flocculation
0,3	0,07	Absence de flocculation
0,4	0,10	Flocculation.
0,5	0,11	Flocculation.
0,6	0,09	Flocculation.
0,7	0,06	Absence de flocculation.
0,8	0,12	Flocculation.
0,9	0,19	Flocculation.
1	0,09	Flocculation.
1,2	0,07	Absence de flocculation.
1,3	0,05	Absence de flocculation.

b) Flocculation par ThCl_4 $\frac{\text{N}}{5000}$

Concentration en ThCl_4 $\frac{\text{N}}{5000}$	Densités optiques	Résultats (au bout de 2 heures)
0,3	0,03	Absence de flocculation.
0,4	0,05	Absence de flocculation.
0,5	0,07	Absence de flocculation.
0,6	0,09	Absence de flocculation.
0,7	0,14	Flocculation.
0,8	0,16	Flocculation.
0,9	0,15	Flocculation.
1	0,04	Absence de flocculation.
1,2	0,02	Absence de flocculation
1,3	0,11	Flocculation.
1,5	0,07	Flocculation.

Les chiffres précédents nous permettent de construire le diagramme suivant (en portant en abscisses les concentrations C en électrolytes et en ordonnées les densités optiques D. O. correspondantes) (1) :



EXPÉRIENCE II.

Floculation de trois fractions de myxoprotéine obtenues à partir du même sérum de bœuf, par $ThCl_4 \frac{N}{5000}$.

I. — *Myxo de première précipitation.*

(Hydrosol à 0,05 %).

Concentration en $ThCl_4 \frac{N}{5000}$	Densités optiques	Résultats (4 heures après)
—	—	—
0,5	0,01	Absence de floculation.
1	0,01	Absence de floculation.
1,5	0,05	Absence de floculation.
2	0,05	Absence de floculation.
2,5	0,08	Floculation.
3	0,12	Floculation.
3,5	0,09	Floculation.
4	0,07	Floculation faible.
4,5	0,07	Floculation faible.
5	0,07	Floculation faible.
5,5	0,03	Absence de floculation.
6	0,02	Absence de floculation.
6,5	0,13	Floculation nette.
7	0,06	Absence de floculation.

1. Ch. Achard et Hodacan, C. R. des séances de l'Académie des sciences, séance du 17 août 1932, t. 195, p. 429.

II. — *Myxoprotéine de deuxième précipitation.*

(Hydrosol à 0,05 %).

Concentration en ThCl^4 N 5000	Densités optiques	Résultats (4 heures après)
0,5	0,03	Absence de floculation.
1	0,09	Floculation.
1,5	0,09	Floculation.
2	0,08	Floculation.
2,5	0,06	Absence de floculation.
3	0,03	Absence de floculation.
3,5	0,02	Absence de floculation.
4	0,04	Absence de floculation.
4,5	0,06	Absence de floculation.
5	0,12	Floculation.
5,5	0,12	Floculation.
6	0,11	Floculation.
6,5	0,11	Floculation.
7	0,07	Floculation peu nette.

III. — *Myxoprotéine de troisième précipitation.*

(Hydrosol à 0, 05%.)

Concentration en ThCl^4 N 50000	Densités optiques	Résultats (4 heures après)
0,5	0,01	Absence de floculation.
1	0,03	Absence de floculation.
1,5	0,02	Absence de floculation.
2	0,02	Absence de floculation.
2,5	0,03	Absence de floculation.
3	0,03	Absence de floculation.
3,5	0,06	Absence de floculation.
4	0,10	Floculation.
4,5	0,11	Floculation.
5	0,11	Floculation.
5,5	0,07	Floculation peu nette.
6	0,07	Floculation peu nette.
6,5	0,05	Absence de floculation.
7	0,09	Floculation.

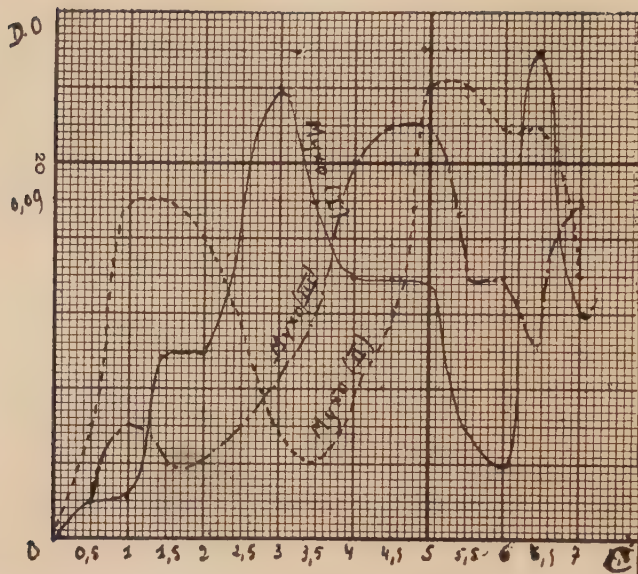


Diagramme représentant les variations de la densité optique des mélanges de 3 fractions de myxoprotéine de bœuf (I) (II) (III) et de $\text{ThCl}_4 \frac{\text{N}}{5000}$.
 C = concentrations en $\text{ThCl}_4 \frac{\text{N}}{5000}$.
 D. O. = densités optiques.

EXPÉRIENCE III. (Myxoprotéine de bœuf.)

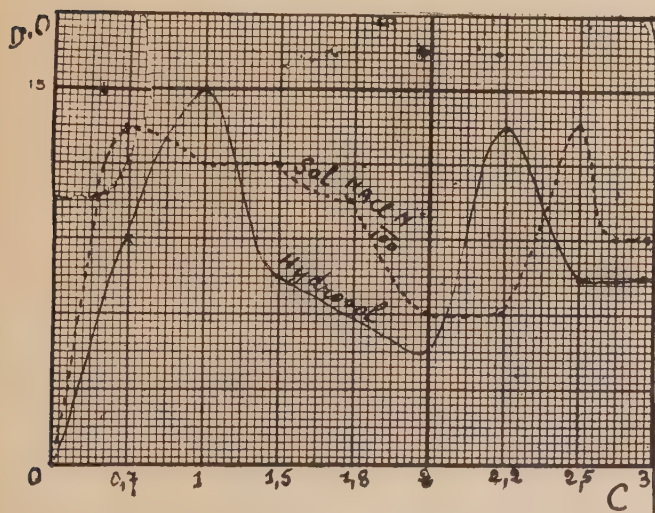
Etude comparative de la floculation par $\text{ThCl}_4 \frac{\text{N}}{5000}$ de deux sols de myxoprotéine à égales concentrations (0,1 %) l'un dans l'eau, l'autre dans $\text{NaCl} \frac{\text{N}}{100}$.

α) Hydrosol de myxoprotéine dans H_2O .

Concentration en $\text{ThCl}_4 \frac{\text{N}}{5000}$	Densités optiques	Résultats (2 heures après)
0,7	0,06	Absence de floculation.
1	0,10	Floculation.
1,5	0,05	Absence de floculation.
1,8	0,04	Absence de floculation.
2	0,03	Absence de floculation.
2,2	0,09	Floculation.
2,5	0,05	Absence de floculation.
3	0,05	Absence de floculation.

β) Sol de myxo dans $\text{NaCl} \frac{N}{100}$.

Concentration en $\text{ThCl}^4 \frac{N}{5000}$	Résultats optiques	Résultats (2 heures après)
0,7	0,09	Floculation.
1	0,08	Floculation.
1,5	0,08	Floculation.
1,8	0,07	Floculation.
2	0,04	Absence de floculation.
2,2	0,04	Absence de floculation.
2,5	0,09	Floculation.
3	0,06	Absence de floculation.



Courbes de floculation par $\text{ThCl}^4 \frac{N}{5000}$ de deux sols de myxoprotéine d'égalles concentrations (0,1 %) l'un dans l'eau, l'autre dans $\text{NaCl} \frac{N}{100}$.

On remarque que ces courbes présentent la même allure avec cette différence que celle qui correspond au sol de myxoprotéine dans NaCl est légèrement décalée vers la gauche du moins dans la première portion. Ce décalage qui était à prévoir est dû à ce que la quantité de $\text{ThCl}^4 \frac{N}{5000}$ nécessaire pour floculer un sol colloïdal contenant déjà un électrolyte, est plus faible que celle qu'il faut pour floculer un hydrosol.

EXPÉRIENCE IV.

Floculation comparée de la globuline et de la myxoprotéine de bœuf par l'acide sulfosalicylique à 0,5 ‰.

L'échantillon de globuline a été préparé et purifié avec soin par M. Piettre.

La floculation a été effectuée sur deux sols obtenus en dissolvant 0 gr. 10 de myxoprotéine et 0 gr. 10 de globuline respectivement dans 100 cc. de NaOH $\frac{N}{1000}$.

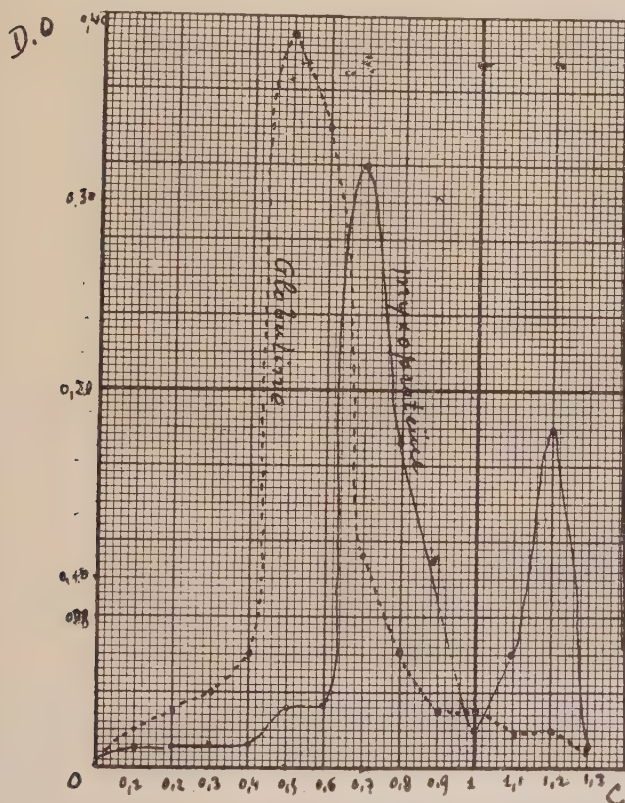
a) *Myxoprotéine* (Solution alcaline 0,1 %).

(Concentration en acide)	(Densités optiques)	Résultats
0,1	0,01	Absence de floculation (n'évolue pas).
0,2	0,01	Absence de floculation.
0,3	0,01	Absence de loculation.
0,4	0,01	Absence de floculation.
0,5	0,03	Absence de floculation.
0,6	0,03	Absence de floculation.
0,7	0,32	Floculation au bout de 12 minutes.
0,8	0,17	Floculation au bout de 10 minutes.
0,9	0,41	Floculation au bout de 4 heures.
1	0,02	Absence de floculation (n'évolue pas).
1,1	0,06	Absence de floculation.
1,2	0,48	Floculation au bout de 12 minutes.
1,3	0,01	Absence de floculation (n'évolue pas).

b) *Globuline* (Solution alcaline à 0,1 %).

(Concentration en acide)	(Densités optiques)	Résultats
0,1	0,02	Absence de floculation (n'évolue pas)
0,2	0,03	Absence de floculation.
0,3	0,04	Absence de floculation.
0,4	0,06	Absence de floculation.
0,5	0,39	Floculation (13 minutes).
0,6	0,34	Floculation (20 minutes).
0,7	0,44	Floculation (6 heures).

(Concentration en acide)	(Densités optiques)	Résultats
0,8	0,06	Abs. de floculation (n'évolue pas).
0,9	0,03	Absence de floculation (n'évolue pas).
1	0,03	Absence de floculation (n'évolue pas).
1,1	0,02	Absence de floculation (n'évolue pas).
1,2	0,02	Absence de floculation (n'évolue pas).
1,3	0,01	Absence de floculation (n'évolue pas).



Courbes de floculation comparée de la globuline et de la myxoprotéine de bœuf par l'acide sulfosalicylique à 0,5 ‰.

CONCLUSIONS. — De l'examen des tableaux et courbes précédentes nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1^o Les courbes de floculation de la myxoprotéine par les électrolytes à cation tri et tétravalent et par les acides pré-

sentent deux zones de floculation et cela d'une façon constante (1). En d'autres termes si on porte un volume V de myxoprotéine à un volume V par addition de solutions salines à cation tri et tétravalent ou par addition d'acide de concentrations croissantes on constate que :

a) à partir d'une certaine concentration C et jusqu'à une concentration C_2 de l'électrolyte dans le mélange, la densité optique augmente avec le temps. Cet accroissement de la densité optique est suivi d'une floculation.

b) pour des concentrations de l'électrolyte supérieures à C_2 et inférieures à C_3 ($C_3 > C_2$) on n'observe ni accroissement de la densité optique, ni floculation.

c) pour les concentrations de l'électrolyte supérieures à C_3 on constate le même phénomène que précédemment c'est-à-dire accroissement de la densité optique suivi de floculation.

2° L'étude comparative de la floculation de la globuline et de la myxoprotéine par le chlorure de thorium à $\frac{N}{5000}$ permettrait de différencier ces deux protéines de propriétés voisines.

L'examen du diagramme IV nous montre en effet :

a) que la *courbe de floculation de la globuline ne possède qu'un optimum* et par suite ne comporte qu'une seule zone.

b) qu'à ce maximum correspond une concentration en acide *plus faible* (0 cm³ 5 que celle correspondante au premier maximum de floculation de la myxoprotéine (0 cm³ 7).

Ce fait tend à prouver encore une fois que la *myxoprotéine est plus stable que la globuline vis-à-vis des électrolytes*.

1. W. Kopaczewski a insisté à plusieurs reprises sur le caractère périodique de nombreuses réactions colloïdales. *La Nature*, 1929. *Biocolloïdologie*, t. III, 1930.

2. — Flocculation par les colloïdes hydrophobes.

Le phénomène de la flocculation réciproque entre un colloïde lyophile et un colloïde lyophobe a été observé pour la première fois par Graham sur les hydrosols de silice et d'albumine par la gélatine.

Plus tard de nombreux exemples furent signalés par Picton, Linder, etc. (1), mais c'est surtout à Hardy et à Biltz (2) que revient le mérite d'avoir établi la loi qui régit ce phénomène de la flocculation réciproque entre colloïdes.

Ils montraient d'une part, que cette flocculation était due au signe des charges électriques des deux colloïdes en présence et qu'on l'observe chaque fois qu'ils sont de signe contraire (règle de Hardy-Biltz). D'autre part qu'elle ne se produit que pour des quantités de sols colloïdaux comprises entre certaines limites bien définies.

Nous nous sommes proposé d'étudier ici la flocculation réciproque des hydrosols de myxoprotéine par les colloïdes hydrophobes suivants : *Sulfure d'arsenic, ferrocyanure de cuivre et hydrate ferrique.*

a) FLOCCULATION PAR LE TRISULFURE D'ARSENIC (NÉGATIF)

Hydrosol de trisulfure d'arsenic As_2S_3 : solution à 1,8 ‰ d'acide arsénieux, 5 minutes H_2S dans 1 litre de solution.

Nous avons réalisé la série des tubes suivants :

Tubes.....	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Hydrosol As_2S_3 dilué au 1/5 en cm^3	6	6	6	6	6	6	6	6
Hydrosol de myxoprotéine à 0,1 %, en cm^3	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	0
Eau distillée	5,5	5	4,5	4	3,5	3	2,5	2

1. Picton Linder, *Journ. Chem. Soc.*, LXXI, 568-573, 1897.

2. Biltz, *Ber XXXVII*, 1909, 5, 1116, 1904.

Résultats :

- Tube V : Trouble.
Tube VI : Légers flocons.
Tube VII : Précipitation complète.
Tube VIII : Flocons (solution verdâtre).

On observe donc une floculation à partir de 2 cm³ 5 d'hydrosol de myxoprotéine pour 6 cm³ d'hydrosol de As²S³ dilué au 1/5.

Cette floculation réciproque obtenue avec deux colloïdes de même signe semble devoir infirmer les lois générales admises sur la floculation de deux colloïdes. On sait toutefois qu'une telle floculation est observée lorsqu'on mélange du sérum sanguin et des hydrosols colloïdaux. Quel que soit le signe du colloïde ajouté au sérum, on observe, pour des proportions déterminées des deux constituants, une floculation totale.

En soumettant le sol As²S³ à l'ultrafiltration sur filtre en collodion très serré (1) nous avons observé que le liquide ultrafiltré flocule nettement le même hydrosol de myxoprotéine dans les proportions trouvées plus haut.

Cette floculation anormale ne peut donc être due qu'aux impuretés électrolytiques (polysulfures, traces de H²S) toujours contenues dans le liquide intermicellaire du sol d'arsenic incomplètement dialysé.

Cette preuve nous a été fournie d'une façon très démonstrative par le résultat *absolument négatif* obtenu, après addition au sol de myxoprotéine, *du même sol de As²S³ mais préalablement soumis à la dialyse pendant 7 jours.*

b) FLOCULATION PAR HYDROSOL DE FERROCYANURE
DE CUIVRE (FeCy⁶ Cu²) (négatif).

Le résultat obtenu a été constamment négatif.

1. Le collodion avait la composition suivante :

Alcool 96°	250 cc.
Ether 65°	700
Coton nitrique.....	50 gr.

c) FLOCCULATION PAR L'HYDROXYDE FERRIQUE
(HYDROSOLS A 0,6 ‰ (positif).

1° En essayant des hydrosols d'hydroxyde ferrique de mêmes concentrations (0,6 ‰) mais dont les durées de dialyse étaient respectivement de 5 jours, 8 jours et 10 jours, on n'observe *aucune floculation*.

Ces trois hydrosols soumis à l'ultrafiltration donnent par contre des liquides qui font au contraire flocculer la myxoprotéine, floculation due à la présence, dans ces sols, d'électrolytes (HCl) qui n'ont pas été suffisamment éliminés.

2° Par contre un hydrosol d'hydroxyde ferrique de même concentration que les précédents, *dialysé 20 jours* provoque *une floculation très nette* de l'hydrosol de myxoprotéine conformément à la loi de Hardy dans les limites indiquées par la série d'essais suivants :

Tubes.....	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Hydrosol de myxoprotéine à 0,1 %, en cm ³ .	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Hydroxyde ferrique à 0,6% dilué au 1/100 et dialysé 20 jours après, en cm ³	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Eau distillée, en cm ³ ..	8	7	6	5	4	3	2	1	0

Résultats :

Tube IV : Trouble homogène.

Tube V : Dépôt lent de flocons.

Tube VI : Floculation nette.

Tube VII : Flocons (solution jaunâtre).

Tube VIII : Troubles (pas de flocons).

L'ultrafiltration de ce même sol d'hydroxyde ferrique a donné un liquide qui, ajouté à l'hydrosol de myxoprotéine dans les limites trouvées n'a provoqué *aucune floculation* ce qui indique bien que les anomalies observées pour les sols d'hydroxyde ferrique précédents provenaient de la présence des ions H de HCl qui n'avaient pas été éliminés.

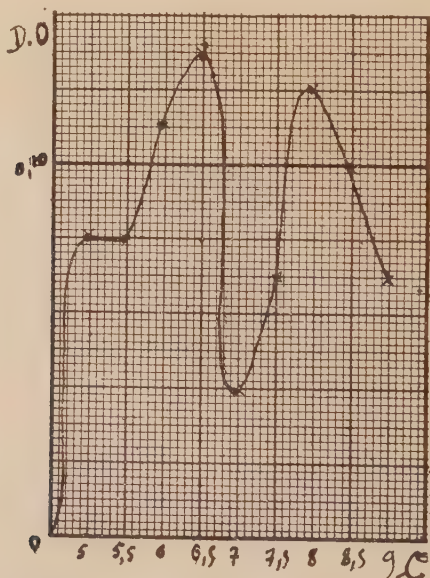
Nous plaçant dans les limites déterminées par les essais

précédents nous avons étudié les variations de la densité optique des mélanges d'hydrosol de myxoprotéine et d'hydroxyde ferrique dialysé 20 jours, ce dernier ajouté sous des concentrations croissantes.

EXPÉRIENCE I.

Floculation réciproque de l'Hydrosol de Myxoprotéine à 0,1 % par l'hydroxyde ferrique à 0,6 ‰ dialysé 20 jours et dilué au 1/100.

Concentration en hydroxyde ferrique	Densités optiques	Résultats
5	0,08	Absence de floculation (n'évolue pas).
5,5	0,08	Absence de floculation.
6	0,11	Floculation (3 heures).
6,5	0,13	Floculation (40 minutes).
7	0,04	Absence de floculation (n'évolue pas).
7,5	0,07	Absence de floculation.
8	0,12	Floculation (1 h. et 30 minutes).
8,5	0,10	Floculation (6 heures).
9	0,07	Absence de floculation (n'évolue pas).



Courbe représentant les variations de la densité optique des mélanges d'hydrosol de myxoprotéine à 0,1 % et d'hydrosol d'hydroxyde ferrique à 0,6 ‰ dialysé 20 jours et dilué au 1/100.

EXPÉRIENCE II.

Floculation comparée de la myxoprotéine et de la globuline de bœuf par l'hydroxyde ferrique.

Nous avons étudié comparativement l'action floculante de l'hydroxyde ferrique sur de la myxoprotéine en suspension dans $\text{NaCl } \frac{\text{N}}{100}$ et de la globuline pure également dans $\text{NaCl } \frac{\text{N}}{100}$, toutes deux à la même concentration 0,1 %.

a) Détermination des limites de floculation de la globuline.

Tubes	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Globuline dans $\text{NaCl } \frac{\text{N}}{100}$ en cm^3	6	6	6	6	6	6	6	6
Hydroxyde ferrique à 0,6 ‰ dialysé 20 j. et dilué au 1/100 en cm^3 :	0,5	0,7	0,9	1	1,1	1,3	1,5	1,7
Eau distillée en cm^3	5,5	5,3	5,1	5	4,9	4,7	4,5	4,3

Résultats :

- Tube I : Négatif.
- Tube II : Négatif.
- Tube III : Flocons.
- Tube IV. — Trouble avec flocons.
- Tube V : Trouble sans flocons.
- Tube VI : Trouble (solution jaunâtre).
- Trouble VII. Trouble (solution jaunâtre).

Les limites de la floculation de la globuline sont donc comprises entre 0,9 cm^3 et 1 cm^3 5 d'hydroxyde ferrique pour 6 m^3 de sol de globuline.

b) Détermination des limites de floculation de la myxoprotéine.

Tubes	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Myxoprotéine dans $\text{NaCl } \frac{\text{N}}{100}$ en cm^3	6	6	6	6	6	6	6	6
Hydroxyde ferrique en cm^3	0,5	0,7	0,9	1	1,1	1,3	1,5	1,7
Eau distillée en cm^3	5,5	5,3	5,1	5	4,9	4,7	4,5	4,3

Résultats .

Tube II : Précipitation nette.
 Tube III : Trouble (sans flocons).
 Tube IV : Trouble.
 Tube V : Trouble.
 Tube VI : Dépôt lent de flocons.

Les limites de floculation sont donc comprises entre 0 cm³ 7 et 1 cm³ 3 d'hydroxyde ferrique pour 6 cm³ de myxoprotéine.

Les mesures de variations de la densité optique effectuées dans les limites indiquées par les essais précédents ont donné les résultats suivants :

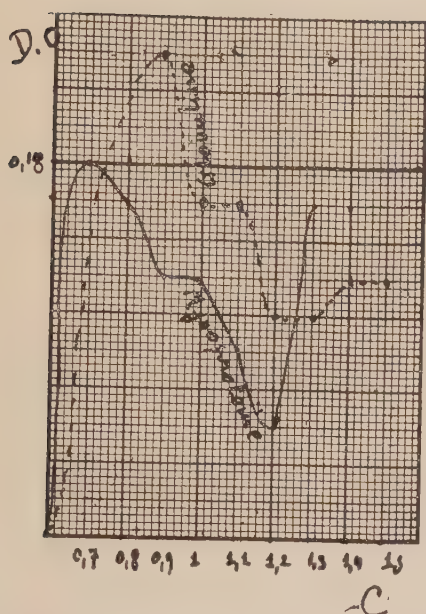
A) Floculation de la Globuline.

Concentration en hydroxyde ferrique	Densités optiques	Résultats
0,9	0,13	Floculation (7 heures).
1	0,09	Floculation (24 heures).
1,1	0,09	Floculation (24 heures).
1,2	0,06	Absence de floculation (n'évolue pas).
1,3	0,06	Absence de floculation.
1,4	0,07	Absence de floculation.
1,5	0,07	Absence de floculation.

B) Floculation de la Myxoprotéine.

Concentration en hydroxyde ferrique	Densités optiques	Résultats
0,7	0,10	Floculation (10 heures).
0,8	0,09	Floculation (24 heures).
0,9	0,07	Absence de floculation (n'évolue pas).
1	0,07	Absence de floculation.
1,1	0,05	Absence de floculation.
1,2	0,03	Absence de floculation.
1,3	0,09	Floculation (24 heures).

Le diagramme suivant construit suivant ces données permet de se rendre compte de l'allure des deux courbes.



CONCLUSIONS. — De l'ensemble des résultats obtenus sur la floculation réciproque de la myxoprotéine et des colloïdes hydrophobes se dégagent les conclusions suivantes :

1^o Tout d'abord la floculation réciproque entre un colloïde lyophile (la myxoprotéine) et un colloïde lyophobe obéit bien à la règle de Hardy Biltz à la condition d'opérer sur des sols de colloïdes lyophobes parfaitement dialysés et non altérés.

2^o Ensuite cette floculation dépend non seulement des granules colloïdaux du colloïde lyophobe mais aussi de l'état de son liquide intermicellaire. Une étude plus approfondie de ce liquide permettrait de préciser ce phénomène de floculation réciproque entre colloïdes.

3^o Enfin la courbe de floculation de la myxoprotéine présente encore ici deux zones. Tandis que celle de la globuline n'a qu'une seule zone, fait que nous avons constaté à propos de la floculation par l'acide sulfosalicylique.

CONCLUSIONS

Ainsi, l'étude de la floculation de la myxoprotéine par la méthode de M. Boutaric nous a amené, M. le professeur Achard et nous-même, à constater un fait expérimental dominant à savoir : l'existence dans la *courbe de floculation de la myxoprotéine de deux zones* qui se retrouvent de façon troublante tout le long de cette étude aussi bien avec les *électrolytes qu'avec les colloïdes hydrophobes*.

A quoi correspondent ces deux zones ? comment expliquer leur présence ? Autant de questions embarrassantes auxquelles les nouvelles recherches viendront sans doute un jour apporter une réponse précise.

Pour le moment M. le professeur Achard et nous-même nous sommes contentés par prudence de formuler deux hypothèses :

1^o Nous avons vu d'après la règle de Hardy-Biltz que la floculation d'un colloïde par un électrolyte ou par un colloïde hydrophobe dépend principalement du signe des charges électriques en présence et qu'elle n'est possible que si ces deux dernières sont de signes contraires.

D'autre part, de nombreux travaux ont démontré la possibilité pour un colloïde de changer de signe : L'expérience de Hardy sur l'influence des ions H et OH sur le signe de la charge du blanc d'œuf dénaturé par la chaleur est classique.

L'hydroxyde ferrique est positif ou négatif suivant le mode de préparation (Oswald), la nature du papier filtre

(Malarski) etc. Le charbon de sang, le kaolin, le sucre prennent des charges différentes suivant le pH du milieu.

On peut donc modifier à volonté le signe d'un colloïde en faisant varier les conditions expérimentales.

Il est dès lors permis de supposer dans notre cas que la *myxoprotéine* qui possède une charge négative, a changé de signe à un moment donné de la floculation pour une concentration déterminée de l'électrolyte floculant ce qui expliquerait l'apparition d'une deuxième zone dans la courbe.

2^o Une autre interprétation vient à l'esprit pour expliquer cette double zone : *admettre la présence dans la myxoprotéine de deux substances différentes qui se comporteraient différemment vis-à-vis de l'électrolyte floculant.*

Faisons remarquer en faveur de cette hypothèse le fait que la *sérum-globuline* fournit des courbes de floculation avec une zone unique.

En ce qui concerne la myxoprotéine, deux constatations permettraient peut-être d'expliquer les particularités de sa courbe de floculation : c'est d'abord la préparation exigeant plusieurs précipitations acétoniques successives et par suite conduisant à admettre des degrés différents de dispersion micellaire ou mieux de grosseurs différentes des particules granulaires. Les diverses fractions de myxoprotéine ont en effet des caractères différents : sensiblement solide au début, huileuse et fluide dans les dernières fractions.

C'est ensuite la grande difficulté signalée par M. Piettre de débarrasser la myxoprotéine des dernières traces de *sérum-albumine* qui l'accompagnent.

Quoi qu'il en soit, l'étude de la floculation de la myxoprotéine nous a permis de mettre bien en évidence un fait expérimental caractéristique de cette protéine à savoir : *l'existence de deux zones* dans la courbe de floculation de la myxoprotéine par les électrolytes et par les colloïdes hydrophobes.

Ces faits apportent sans doute une intéressante contribution à l'étude à peine ébauchée de la myxoprotéine et justifient l'hypothèse de sa complexité déjà soupçonnée par le changement de coloration au froid (Piettre).

II. — Etude de la viscosité.

On appelle viscosité ou frottement interne la résistance que présente un liquide au mouvement de ses particules.

Comme on le sait, il existe un grand nombre de procédés de mesure de la viscosité d'un liquide.

1^o On mesure la vitesse de chute d'une bille métallique tombant dans le liquide puis on calcule la viscosité en appliquant la loi de Stokes.

2^o Ou bien on observe l'amortissement d'un disque oscillant au sein du liquide.

MÉTHODE UTILISÉE

3^o Ou enfin on mesure la vitesse d'écoulement dans un tube étroit.

C'est cette dernière méthode que nous avons choisie pour mesurer la viscosité des protéines et en particulier la myxoprotéine en utilisant le tube viscosimétrique d'Oswald.

PRINCIPE. — Le principe de cette méthode consiste à évaluer successivement pour une même température, la durée d'écoulement à travers un tube capillaire entre deux repères fixes :

1^o de l'eau pure.

2^o du liquide à mesurer.

Le rapport de ces deux durées = V (représentant le temps d'écoulement du liquide la valeur en eau de l'appareil employé) donne la viscosité relative du liquide étudié par rapport à l'eau,

L'APPAREIL D'OSWALD. — 1^o Le tube viscosimétrique d'Oswald se compose en substance d'un tube en U dont l'une des tiges *a* est capillaire.

Il porte deux ampoules dont l'une C située au bas de l'appareil et l'autre B sur la tige capillaire. Cette dernière ampoule porte deux traits 1 et 2.

A l'extrémité du tube *a* est adapté un tube en caoutchouc permettant d'aspirer le liquide.

L'appareil est posé sur un support spécial permettant de le maintenir bien verticalement.

2^o *Thermostat*. — La viscosité d'un liquide étant au plus haut degré fonction de la température il est nécessaire d'effectuer les mesures dans un thermostat.

Celui que nous avons employé est une grande cuve de verre remplie d'eau chauffée au moyen d'un bec de gaz muni d'un régulateur à mercure. Un thermomètre gradué au dixième de degré est plongé dans la cuve. Un agitateur automatique actionné par le courant fourni par une pile, assure un brassage continu de l'eau de la cuve.

TECHNIQUE. — La technique comprend deux phases :

1^o *Détermination de la valeur en eau du viscosimètre employé*. — Cette détermination a été faite toujours à la température de 26° de la façon suivante :

On verse dans le tube large *d* une quantité d'eau distillée telle que l'ampoule *c* soit incomplètement remplie.

On transporte alors l'appareil dans le thermostat et le pose bien verticalement, on allume le bec de gaz et règle la température à 26°.

On aspire alors l'eau de l'ampoule C jusqu'à un niveau légèrement plus élevé que le trait 1. L'ampoule C doit alors être presque vide, on aura soin d'éviter pendant cette aspiration l'entrée des bulles d'air dans le tube capillaire.

On laisse l'eau tomber de son propre poids et lorsque

son niveau affleure au trait 1, on met en marche le chronomètre (donnant le cinquième de seconde). Dès qu'elle affleure au niveau 2 on arrête le chronomètre.

2° *Détermination de la viscosité d'une solution colloïdale.* — On opère dans les mêmes conditions.

Mesure de la viscosité des sels de myxoprotéine. — Nous avons étudié l'influence de la température, de la concentration et des électrolytes sur la viscosité de la myxoprotéine.

I. — *Influence de la température sur la viscosité des hydrosols de myxoprotéine de bœuf et de taureau à 0,1 %.*

Valeur en eau du viscosimètre = 80/5 secondes.

Température	Myxoprotéine de bœuf		Myxoprotéine de taureau	
	Temps d'écoulement	Viscosité	Temps d'écoulement	Viscosité
26°	84/5	1,05	87"	1,08
Après 1 h. de chauffage à :				
40°	84"	1,05	87"	1,08
50°	84"	1,05	87"	1,08
57°	84"	1,05	87"	1,08
60°	84"	1,05	87"	1,08

II. — *Influence de la concentration.*

Nous avons effectué les mesures de viscosité à $t = 26^{\circ}$ sur de la myxoprotéine dissoute dans $\text{NaOH} \frac{\text{N}}{100}$, en faisant varier les concentrations.

Myxoprotéine de bœuf		Myxoprotéine de taureau	
Concentration en myxoprotéine %	Viscosité	Concentration en myxoprotéine %	Viscosité
0 gr. 02	1,02	0 gr. 02	1,12
0 gr. 07	1,06	0 gr. 07	1,17
0 gr. 1	1,24	0 gr. 1	1,29
0 gr. 2	1,27	0 gr. 2	1,34
0 gr. 4	1,40	0 gr. 4	2
0 gr. 6	1,60	0 gr. 6	2,6

III. — Influence des électrolytes.

A 6 cmc. d'un hydrosol de myxoprotéine de bœuf à 0,1 % on ajoute 0 cm³ 8 de ThCl⁴ $\frac{N}{5000}$. On observe une floculation. On détermine la viscosité du liquide floculé à $t = 26^{\circ}$.

La viscosité trouvée = 1,07, valeur sensiblement égale à 1,05 trouvée précédemment.

CONCLUSION. — Il ressort des résultats précédents :

1^o Que le chauffage préalable du sol de myxoprotéine n'exerce aucune influence sur sa viscosité mesurée à 26°.

2^o Que la viscosité augmente au contraire avec les concentrations en myxoprotéine. — Cette augmentation peu sensible pour la myxo de bœuf s'est trouvée au contraire plus marquée pour celle du taureau.

3^o Que pendant la floculation il n'y a pas augmentation sensible de la viscosité. — Il n'y a donc pas eu de phénomène d'hydratation de la matière lors de la floculation mais accolement des particules entre elles.

III. — Détermination du Facteur ω

M. Boutaric a montré récemment comment on pouvait évaluer, à une constante près, le nombre de granules présents dans un sol colloïdal par gramme de matière desséchée.

Cette méthode de mesure (1) a permis de suivre l'évolution granulaire d'un hydrosol au cours des transformations se produisant dans les milieux troubles et a été appliquée par

1. Boutaric, *Bull. de la Soc. chimique*, 10 décembre 1930.

MM. Achard, Boutaric (1) et Doladilhe à l'étude physico-chimique des sérums sanguins normaux et pathologiques.

PRINCIPE.

Le principe de la méthode est le suivant : La densité optique h (2) d'un sol colloïdal est proportionnelle (à la seule condition que la formule de Rayleigh soit applicable) au volume individuel des particules et cela quelle que soit la manière dont se produisent les particules, par simple agglomération de molécules, par gonflement de celles-ci, au sein du solvant, ou à la fois par agglomération et gonflement.

On sait d'autre part que la viscosité d'un liquide contenant des particules sphériques est donnée par la formule suivante due à Einstein :

$$\eta = \eta_0 (1 + 2,5 \varphi)$$

η = coefficient de viscosité du liquide utilisé comme solvant.

η_0 = coefficient de viscosité de la suspension.

φ = volume total de particules contenues dans l'unité de volume de la suspension.

d'où on tire :

$$\eta = \eta_0 + 2,5 \varphi \eta_0$$

$$\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = 2,5 \varphi$$

$$\varphi = f \left(\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \right) = f \left(\frac{\eta}{\eta_0} - 1 \right)$$

En conséquence, le quotient :

$$\frac{\frac{\eta}{\eta_0} - 1}{h} = \frac{\eta}{\eta_0} - 1 \times \frac{1}{h}$$

1. C. R. Acad. Sciences, t. 193, p. 271, séance 3 août 1931.

2. Formule de Rayleigh : $I = I_0 e^{-hI}$; I désignant l'intensité du faisceau lumineux traversant le milieu trouble d'épaisseur h I_0 est le faisceau incident.

On appelle en général densité optique l'expression : $\log \frac{I_0}{I}$ laquelle est proportionnelle à h .

proportionnel au quotient du volume total des particules par le volume individuel d'une seule particule *donne le nombre total de particules par gramme de matière.*

Ce quotient est le facteur ω .

TECHNIQUE.

La détermination du facteur ω se ramène donc à mesurer :

1^o la viscosité relative du sol colloïdal par rapport à l'eau à la *température de 26°* au moyen du viscosimètre d'Oswald.

2^o la densité optique h au moyen du photomètre Bricq-Yvon. On calcule le facteur en appliquant la formule précédente dans laquelle :

τ_1 = temps d'écoulement du sol colloïdal.

τ_{10} = valeur en eau du viscosimètre d'Oswald.

h = densité optique mesurée au photomètre.

Voici les résultats que nous avons obtenus en faisant les déterminations sur la myxoprotéine de bœuf et de taureau en solution 0,2 % dans la soude NaOH $\frac{N}{100}$.

A) Myxoprotéine de bœuf 0 gr. 2 % dans NaOH $\frac{N}{100}$.

	Température	$\frac{\eta}{\eta_0}$	h	ω calculé
	26°	1,29	0,07	4,14
Après 15 m. de chauffage à	40°	1,31	0,15	2,06
30 minutes de chauffage à	40°	1,31	0,17	1,08
1 heure de chauffage à	50°	1,30	0,28	1,07
1 heure de chauffage à	57°	1,31	0,29	1,06

B) Myxoprotéine de taureau.

	Température	$\frac{\eta}{\eta_0}$	h	ω calculé
	26°	1,34	0,05	6,8
Après 30 m. de chauffage à	40°	1,32	0,21	1,05
1 heure de chauffage à	50°	1,34	0,23	1,04
1 heure de chauffage à	57°	1,34	0,33	1

CONCLUSIONS. — Nous voyons donc que le facteur ou nombre de particules colloïdales de myxoprotéine par gramme de matière sèche *diminue avec la température* puisque la viscosité restant pratiquement invariable la densité optique par contre augmente nettement.

La sérum-albumine à cet égard se comporte d'une façon analogue. *Les particules de myxoprotéine ne s'hydratent* donc pas mais grossissent par accolement et leur nombre diminue comme le montre le quotient. Or des recherches récentes de MM. Achard et Boutaric (1) ont montré que les facteurs ω déterminés sur le sérum entier ont sensiblement les mêmes valeurs que celles obtenues à partir des protéines séparées par la méthode à l'acétone.

IV. — Détermination du Signe de la Charge Electrique de la Myxoprotéine (Electrophorèse)

On sait que lorsqu'on établit une différence de potentiel dans une solution colloïdale entre deux électrodes de platine les granules colloïdaux se déplacent, ce qui montre qu'ils possèdent une charge électrique.

Lorsque ces granules se transportent à l'anode on dit que le colloïde est négatif. Quand ils vont à la cathode on dit qu'il est positif.

APPAREIL EMPLOYÉ.

Pour étudier le transport électrique nous nous sommes servis du dispositif classique qui se compose d'un tube en U portant dans chaque branche un robinet.

Les robinets étant ouverts on verse dans le tube un hydrosol de myxoprotéine à 0,1 %. On ferme les robinets

1. MM. Achard, Boutaric, Doladilhe, C. R. Académie des Sciences, t. 193, p. 271, séance du 3 août 1931 ; Achard, Boutaric, M^{lle} Gautherot, C. R., juin-juillet 1932.

et on enlève l'excès de l'hydrosol. On rince soigneusement et on remplit ensuite jusqu'au même niveau les deux branches du tube avec de l'eau distillée.

On ouvre alors doucement les robinets de façon à ne pas mélanger le colloïde et l'eau. On introduit dans chaque branche une électrode de Pt et on fait passer un courant de 60 volts environ fourni par un accumulateur.

Au bout de 2 à 3 heures on observe que, dans la branche où plonge l'anode, la surface de séparation entre l'eau et l'hydrosol de myxoprotéine s'est déplacée vers le haut.

CONCLUSION. — La myxoprotéine possède donc une charge *négative*, de même que la globuline, tandis que la sérum-albumine paraît rester indifférente.

V. — Fixation des matières colorantes.

PRINCIPE.

Le principe sur lequel est basée l'étude de la fixation d'une matière colorante sur un colloïde est le suivant (1) :

Quand on introduit un colloïde dans une solution aqueuse de matière colorante, on observe, pour chaque longueur d'onde absorbée, une diminution du coefficient d'absorption lumineuse de la matière colorante lorsqu'il y a fixation. Au contraire lorsque la matière colorante n'est pas fixée sur le colloïde la variation du coefficient d'absorption lumineuse est nulle ou peu appréciable.

Or le coefficient d'absorption lumineuse est, dans les limites de concentration où le colorant suit la *loi de Beer*, proportionnel à la concentration en matière colorante.

Si le colorant étudié ne suit pas la loi de Beer, on peut, par une série de mesures tracer graphiquement la courbe

1. Maurice Doladihle, thèse de doctorat ès sciences physiques. Dijon.

représentative des variations du coefficient d'absorption lumineuse en fonction de la concentration.

De toute façon *la mesure de la diminution d'absorption lumineuse* permet d'évaluer d'une façon très commode la quantité de matière colorante fixée sur les granules colloïdaux.

LA TECHNIQUE.

Elle sera rapidement indiquée. La mesure de l'absorption lumineuse est faite au moyen du spectrophotomètre de Féry de la façon suivante :

a) On introduit sur un des faisceaux du spectrophotomètre une cuve contenant un volume V de la solution de matière colorante diluée dans un même volume d'eau.

Sur l'autre faisceau on met une cuve identique contenant de l'eau pure.

On détermine l'absorption de la solution colorante dans toute l'étendue du spectre.

b) On recommence l'expérience en introduisant sur le premier faisceau du spectrophotomètre la même cuve contenant un volume V de solution de matière colorante additionné d'un égal volume d'un sol colloïdal, puis sur l'autre faisceau une cuve identique contenant le volume V de colloïde dilué dans un égal volume d'eau. On détermine l'absorption de la matière colorante dans toute l'étendue du spectre.

Si K représente le coefficient d'absorption lumineuse de la matière colorante et K' le coefficient d'absorption lumineuse de la matière colorante additionnée du colloïde $\frac{K - K'}{K}$ donne le cas où la loi Beer est applicable, la fraction de matière colorante fixée.

A l'aide de cette méthode nous avons fait un certain nombre de déterminations d'une part sur la myxoprotéine

dissoute dans divers solvants (eau et $\text{NaCl } \frac{\text{N}}{100}$) et d'autre part sur un sol de globuline dans $\text{NaCl } \frac{\text{N}}{100}$ de même concentration.

Les tableaux suivants résument les résultats obtenus.

A) *Hydrosol de myxoprotéine de bœuf à 0,1 %.*

Fixation par le Bleu Victoria

(positif) à 0 gr. 03 ‰

Valeur de K = 22

Fixation par le Bleu diamine

(négatif) à 0 gr. 03 ‰

(Raie du Sodium) Valeur de K = 19

Sol de myxoprotéine	Valeurs de K'	Concentration en myxoprotéine	Valeurs de K'
1 cm ³	22	2 cm ³	20
3 cm ³	24	4 cm ³	22
4 cm ³	23	5 cm ³	24
5 cm ³	24	6 cm ³	21
6 cm ³	26	7 cm ³	23
7 cm ³	23	8 cm ³	22
9 cm ³	25	9 cm ³	22

B) *Sol de myxoprotéine à 0,1 % dans $\text{NaCl } \frac{\text{N}}{100}$*

Fixation par le Bleu Victoria

(positif) à 0,03 ‰

Valeur de K = 30

Fixation par le Bleu diamine

(négatif) à 0,03 ‰

Valeur de K = 25

Sol de myxoprotéine	Valeurs de K'	Concentration en myxoprotéine	Valeurs de K'
1 cm ³	27	2 cm ³	25
2 cm ³	31	4 cm ³	26
3 cm ³	29	5 cm ³	25
4 cm ³	30	6 cm ³	27
5 cm ³	33	7 cm ³	27
6 cm ³	29	8 cm ³	30
7 cm ³	32	9 cm ³	28
8 cm ³	30		
9 cm ³	28		

Fixation du Bleu Victoria par un sol de Globuline bien purifiée.

à 0 gr. 1 % dans NaCl $\frac{N}{100}$.

Valeur de K = 30.

Sol. de globuline	Valeur de K'
1 cm ³	31
2 cm ³	29
3 cm ³	26
4 cm ³	27
5 cm ³	25
6 cm ³	23
7 cm ³	23
8 cm ³	20
9 cm ³	19

Au bout de 24 heures les tubes 6, 7, 8, 9 ont *floculé*.

On sépare les floculats par centrifugation (20 minutes) et on détermine de nouveau les valeurs de K'' des liquides surnageants.

Liqueurs surnageantes dans les tubes	Valeurs de K''
6	8
7	6
8	5
9	3

CONCLUSIONS. — Il ressort des mesures précédentes.

1^o que l'addition des matières colorantes à un sol de myxoprotéine *ne provoque pas une diminution du coefficient d'absorption lumineuse de la matière colorante*. On constate au contraire une très légère augmentation de ce coefficient.

D'autre part des mesures au photomètre Bricq-Yvon nous ont permis de déceler, pour ces mélanges, une augmentation parallèle du coefficient de diffusion lumineuse.

Il semble qu'on assiste ici à un grossissement granulaire

résultant de l'accolement des granules du colloïde et de la matière colorante.

De toute façon le phénomène observé est tout à fait différent de celui qui se produit lorsque le colloïde introduit dans la matière colorante est un lyophobe.

2^o Pour la globuline au contraire on constate *une diminution du coefficient d'absorption lumineuse avec les matières colorantes colloïdales de signe positif ce qui semble indiquer une fixation de leurs granules.*

La globuline et la myxoprotéine se comportent donc d'une façon différente vis-à-vis des matières colorantes. Cette étude exige encore de nouvelles et nombreuses recherches.



CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Ce travail est consacré tout spécialement à l'étude des protéines du sérum normal.

Il se divise en deux parties principales : la première se rapportant à la technique de préparation des protéines sériques et la deuxième à l'étude particulière de ces substances et plus spécialement à l'une d'elles « la myxoprotéine » isolée en 1922 par M. Piëttre.

I. — Deux précisions intéressantes ont été apportées à la technique de la méthode à l'acétone telle que l'a exposée M. Arcand dans sa thèse de pharmacie (Paris).

a) La complète précipitation de la sérum-globuline exige désormais que la floculation par les acides soit faite après une dilution aqueuse *trois fois plus grande que le volume de sérum mis en œuvre*.

b) La floculation de la myxoprotéine, demande *une dilution double* du volume de la liqueur traitée.

c) La myxoprotéine, en dehors de la technique habituelle des floculations successives par l'acétone, peut être obtenue pure à l'aide de la simple dialyse aqueuse et de l'électrodialyse, après élimination préalable de la sérum-globuline.

Ces techniques ont le grand avantage d'éviter l'emploi des solvants tels que l'acétone ou alcool et par suite d'écarter toute hypothèse de condensation et de dénaturation.

d) Les rendements par dialyse sont cependant légèrement

inférieurs, on obtient seulement 75 à 80 % de la myxoprotéine totale.

e) L'étude de la dialyse aqueuse appliquée au sérum entier met en lumière le rôle non seulement des électrolytes mais surtout des non-électrolytes dans la stabilité du milieu sérique.

f) l'électrodialyse, si elle a le grand avantage de conduire à une élimination complète des électrolytes, a l'inconvénient d'aller trop loin et de ne pas respecter l'intégrité de la micelle protéidique. En particulier elle enlève à la sérum-albumine son calcium d'ailleurs assez lâchement combiné puisqu'il peut être enlevé par les oxalates alcalins.

g) La déminéralisation des mélanges myxoprotéine albumine conduit en règle générale, à la production des sols acétoniques. Ces sols sont rompus par l'addition d'électrolytes au contraire leur stabilité est augmentée par la dilution aqueuse.

II. — L'étude des protéines et en particulier de la myxoprotéine apporte les connaissances théoriques suivantes :

1^o Propriétés chimiques :

a) La myxoprotéine présente un aspect physique tout différent des deux autres protéines. C'est une substance grisâtre, visqueuse donnant lieu au phénomène de la synérèse ; la sérum-albumine est sirupeuse, presque fluide ; la sérum-globuline est blanche, grenue, facile à laver.

b) Dans l'eau elle est relativement soluble environ 1 gr. ‰ pour la première fraction et 0 gr. 3 ‰ pour les autres fractions.

La globuline est pratiquement insoluble dans l'eau, et la sérum-albumine très fortement soluble.

c) Elle est nettement soluble dans les solutions d'électrolytes neutres et cette solubilité augmente avec la température,

d) Elle n'est floculée que par les sels à cation polyvalent (AlCl_3 , ThCl_4).

En ce qui concerne les acides, seuls l'acide trichloracétique et l'acide sulfosalicylique la précipitent nettement. Ce dernier précipite incomplètement la globuline et très mal la sérum-albumine en donnant des liqueurs opalescentes.

e) Au point de vue de sa teneur en azote (14,35 %) et en soufre (1,1 %) elle occupe une place intermédiaire entre la sérum-globuline et la sérum albumine tout en se rapprochant davantage de cette dernière.

f) Elle ne renferme pas de calcium alors que la sérum-albumine en contient normalement.

Sa très faible teneur en lipides d'entraînement et surtout en lipides phosphorés (moins de 1 %) la distingue du gliode de Botazzi très riche en mélange phospho-lipides et stérols.

2° Propriétés physico-chimiques.

a) Le caractère le plus frappant des sols de myxoprotéine est leur *remarquable stabilité* vis-à-vis des électrolytes.

Les électrolytes à cation *mono* et *divalent* employés même à doses massives ne *floculent pas* la myxoprotéine.

Par contre l'addition des quantités faibles mais déterminées d'électrolytes à cation tri, et tétravalent (ThCl_4) et d'acides trichloracétique et sulfosalicylique, provoque une *floculation nette*.

b) L'étude systématique des courbes de flocculation par ces électrolytes montre un fait des plus intéressants : l'existence de deux maxima et de deux minima, correspondant à deux *zones de flocculation* et cela d'une façon constante.

M. Achard et nous-même avons proposé de ce fait deux interprétations : existence de deux substances différentes ou plus simplement changement de signe au cours de la

floculation comme il a été constaté déjà dans l'étude des colloïdes (floculations périodiques de Michaelis).

c) La floculation réciproque de la myxoprotéine par les colloïdes hydrophobes est un phénomène complexe qui *dépend non seulement du signe des charges électriques des deux colloïdes en présence mais aussi de l'état du liquide intermicellaire du colloïde hydrophobe.*

On retrouve ici encore (avec l'hydroxyde ferrique bien dialysé) la même forme de courbe (avec deux zones) que dans les cas d' AlCl_3 et ThCl_4 .

d) Les courbes de floculation de la sérum-globuline pure, par l'acide sulfosalicylique et par l'hydroxyde ferrique, au contraire sont *parfaitement régulières*. C'est là un nouveau point de différenciation précieux entre ces deux protéines.

La résorcine (Piettre) flocule très activement la sérum albumine.

e) *La viscosité* de la myxoprotéine préalablement desséchée est très faible.

Le chauffage du sol de myxoprotéine n'exerce aucune influence sur sa viscosité mesurée à 26° .

Elle augmente au contraire avec les concentrations de myxoprotéine.

Pendant la floculation la viscosité ne varie pas, ce qui indique qu'il n'y a pas eu de phénomène d'hydratation de la myxoprotéine lors de la floculation, mais simplement accolement des particules entre elles.

f) La viscosité restant constante, la densité optique de la myxoprotéine augmente par contre très nettement avec la température comme indique la diminution du facteur ω .

Dans les mêmes conditions la densité optique de la sérum-globuline varie très peu, *celle de la sérum-albumine augmente par contre considérablement* (Achard, Boutaric, Doladhile).

g) Enfin il résulte des mesures de coefficient d'absorption lumineuse que la myxoprotéine ne semble pas fixer les matières colorantes. La globuline, les fixe nettement.

3^o Propriétés physiologiques.

L'étude en a été à peine commencée. Les injections intra veineuses, intra péritonéales ou sous cutanées chez le lapin, le chien et le cobaye ne provoquent que des accidents anaphylactiques très atténués.

En terminant, il nous est un devoir très doux d'adresser à notre illustre maître, M. le professeur Achard un témoignage de profonde et respectueuse gratitude pour la bienveillance qu'il nous a témoignée au cours de ces longues et délicates recherches qu'il a inspirées avec la claire vision de leur utilité en biologie médicale.

Nous sommes heureux aussi de remercier d'une façon particulièrement vive M. Maurice Piettre, directeur du Laboratoire des Halles Centrales de Paris, qui nous a guidé, conseillé, encouragé avec sa grande compétence bien connue en ce domaine si neuf de la science, ainsi que M. le professeur A. Boutaric auquel nous devons la plus savante direction dans son laboratoire de la Faculté des Sciences de Dijon d'où sont sortis tant de travaux remarquables sur la physico-chimie des colloïdes.

Vu : le Président de la thèse,
COUTIÈRE.

Vu : le Doyen,
GUÉRIN.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
CHARLETY.

BIBLIOGRAPHIE

- Achard (Charles), Augustin Boutaric.* — Comptes rendus des Séances de l'Académie des sciences, t. 192, p. 1611-1931.
- Achard (Charles), Augustin Boutaric, Maurice Doladhillé.* — C. R., t. 193, p. 271, 1931.
- C. R., t. 194, p. 1877, 1932.
- Achard (Charles), Maurice Piettre.* — C. R., t. 194, p. 221, 1932.
- Achard (Charles) et Hô dac an.* — C. R., t. 195, p. 249, août 1932.
- Achard (Charles).* — C. R., t. 194, p. 1877, mai 1932.
- Alexander.* — Colloid Chemistry Chemical, catalog Compagny 1926, London.
- Abderhalden (E.) et Komm (E.).* — Zeit f. physiol. chem., 1924, t. 139, p. 199.
- Abderhalden (E.) et R. Haas.* — Zlochr f. physiol., chem., 1926, t. 155, p. 200-205.
- Deuxième mémoire, idem, 1926, t. 160, p. 256-262.
- Abderhalden (E.).* — Pfluger's arch., 1922, C. X. C. V., 199.
- Naturwissenschaften, 1924, t. 12, p. 16.
- Arcand (Arthur).* — Thèse de pharmacie (Paris), 1930.
- Boutaric (Augustin).* — Les colloïdes et l'état colloïdal. Lib. Félix Alcan, Collect. Borel.
- Bulletin de la Société chimique de France, p. 146, 1927.
- Revue générale des colloïdes, 5^e année, n° 40, 1927.
- J. pharmacie et de chimie, t. VII, p. 295 et 456, n° 28.
- C. R., t. 191, 1930, p. 1332.
- Boutaric (Augustin) et Perreau (M^{lle}).* — C. R., t. 183, p. 205, 1926.
- C. R., t. 184, p. 814, 1927.
- Blanchetière (A.).* — L'évolution de nos connaissances sur la structure chimique des matières protéiques (Bull. Soc. de chimie biol., t. VII, 1925, p. 218-330).
- Bull. Soc. chim., 1927, t. XXXXI, p. 101.
- Bary (Paul).* — Les colloïdes Dunod, Paris 1921.
- Où en est la chimie colloïdale. Gauthier-Villars, Paris, 1927.

- Bogue (Robert Herman).* — Traité de chimie colloïdale (Traduction de Barbaudy). Hermann, 1930.
- Burton.* — The physical properties of colloïdal solutions. Longmans, greenn and Co, New-York.
- Boutroux (A.).* — C. R., séance du 30 mars 1931.
- Clayton (W.).* — The Theory of emulsions and emulsification.
- Collon et Mouton.* — Les ultra microscopes, Masson, Paris, 1906.
- Cohen (E.J.).* — J. Gen. Physiol., t. IV, p. 697, 1921-1922.
- Denigès.* — Précis de chimie analytique.
- Duclaux (J.).* — Recherches sur les substances colloïdales. Thèse série A. 477, n° 1185. Barnéoud, Laval, 1904.
- Les colloïdes. Gauthier-Villars, Paris, 3^e édition, 1925.
- Dhéré (C.).* — Electrodialyse, 783 (Biochem. Zeit., t. 153, p. 504-505, 1924).
- Bull. Soc. chim. Biol., t. 8, p. 146-660, 1926.
- Bull. Soc. Biol., t. 8, p. 604, 1926.
- Dhéré et Burdel.* — C. R., 1914.
- Donnan (F. G.).* — Z. Electrochem., t. XVII, p. 572, 1911.
- Donnan (F. G.) et Allmand (A. J.).* — J. chem. Soc., t. CV, p. 1963, 1914.
- Donnan (F. G.) et Garner (W. E.).* — J. Chem. Soc., t. CXV p. 1313, 1919.
- Doladhile (M.).* — Thèse sciences-physiques. Faculté de Dijon.
- Fiocher (E.).* — Polypeptide und Protéine, I, 1899-1906 ; II, 1907-1919. Springer, Berlin.
- Ber. chem. ges., 39, 1906, p. 559.
- Fenn (W. O.).* — J. Biol. Chem., t. XXXIII, pp. 279 et 439).
- Freundlich (H.).* — Kapillarchemie, Leipzig, 1909.
- New conceptions in colloidal chemistry. Metheren, London, 1926.
- Grimbert.* — Précis de diagnostic, 4^e édition. J. Lamarre. Paris.
- Hardy (W. B.).* — Proc. Roy. Soc., t. LXVI, p. 110.
- J. Physiol., t. XXIX, p. 29, 1903.
- J. Physiol., t. XXXIII, p. 251, 1905-1906.
- Proc. Roy. Soc., t. LXXIX, p. 413, 1097.
- J. Physiol., t. XXXIII, pp. 256-257, 1905-1906.
- Howe (Paul).* — Journal of biological chemistry, 1931.
- Hüchcock (D. I.).* — J. gen. Physiol., et IV, p. 597, 1921-1922 et t. V, p. 35, 1922-1923.
- Hofmeister (F.).* — Arch. exp. Path. u. Pharm., t. XXIV, p. 247, 1888, t. XXV, p. 1. 1888-1889 ; t. XXVII, p. 395, 1890 ; t. XXVIII, p. 210, 1891.

- Holmès*. — Laboratory manual of colloïd chemistry. Wiley, New-York, 1922.
- Kopaczewski (W.)*. — Théorie et pratique des colloïdes en biologie et en médecine. Vigot, Paris, 1923.
- Traité de biocolloïdologie. Gauthier-Villars, 1930.
- Kauder (G.)*. — Arch. exp. Path et Pharmacol., 1888, XXIV, p. 247. Villars, Paris, 1926.
- Kruyt (H. R.)*. — Revue générale des colloïdes, n° 55, 1928, p. 118-133 et n° 56, 1928, p. 149-160. On trouvera dans cet article les principales références concernant les travaux de Kruyt.
- Lecomte du Nouÿ*. — Equilibres superficiels des solutions colloïdales. Masson, Paris, 1929.
- Loeb (J.)*. — Les Protéines. Alcan, Paris, 1924.
- La théorie des phénomènes colloïdaux. Alcan, Paris, 1925.
- La conception mécanique de la vie. Alcan, Paris, 1925.
- Langmuir (I.)*. — J. Am. Chem. Soc., t. XL, p. 1361, 1918.
- Michaelis*. — Manuel de technique de physico-chimie et spécialement de chimie des colloïdes. Traductions de H. Chabanier et C. Lobo-Onell, Masson, Paris, 1923.
- The effects of ions in colloïdal systems, Williams and Wilknis Compagny, Baltimore, 1925.
- Northrop (J. H.)*, et de *Krnif (P. H.)*. — J. gen. physiol., t. IV, p. 629, 1921-1922.
- J. Gen. Physiol., t. III, p. 715, 1920-1921.
- Oswald*. — Manipulations de chimie colloïdale, Gauthier-Villars, Paris.
- The physics and chemistry of colloïds: Report of a general discussion. The Faraday Society and the Physical Society of London, Majesty's Stationery Office, 1921.
- Piettre (Maurice)*. — Archivos do Instituto Vital Brazil, t. I, fasc. I, 1922, t. II, fasc. 2, 1923.
- Piettre (Maurice) et Vila*. — Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences, t. CLXX, 1920, p. 1466 et CLXXI, 1920, p. 372.
- Piettre (Maurice)*. — Journal de pharmacie et de chimie, 8^e série, t. III, p. 97, 1926.
- Piettre (Maurice) et Chrétien*. — Biochimie de l'hémolyse, 1927 (Archives de Pathologie comparée).
- Biochimie de l'agglutination, 1930 (Archives de Pathologie comparée).
- Piettre (Maurice) et Vila*. — C. R., t. CLXX, 1928, p. 1466 et CLXXI, 1920, p. 372.
- Piettre (Maurice)*. — C. R., séance, 2 décembre 1929.

- C. R., t. 88 (1929), p. 463.
— C. R., séance du 4 février 1929, t. 186, p. 1657.
— C. R., 186, 1928, p. 1657.
Piettre (Maurice) et André Guilbert. — C. R., séance du 18 juillet 1932.
Piettre (Maurice). — C. R., 186, 1928, p. 1657 et 192, 1931, p. 894.
— C. R., 189, 1929, p. 1034.
Pauli (W.). — Fortschr naturwiss Forschung, t. IV, p. 223, 1912.
— Kolloid chemie der Eiweisskörper, Dresde, Leipzig, 1920.
Perrin (J.). — J. Chim. physique, t. II, p. 601, 1904, t. III, p. 50, 1905 :
notice sur les titres et travaux scientifiques de M. Jean Perrin,
Paris, 1918.
Procter (H. R.). — J. chem. Soc., t. CV, p. 313, 1914.
Procter (H. R.) et Wilson (J. A.). — J. chem. Soc., t. CIX, p. 307, 1916.
Rocasolano. — Eléments de chimie physique colloïdale, Gauthier-Villars,
Paris, 1920.
Robertson (T. B.). — The physical Chemistry of the Proténis, p. 297,
New-York-Londres, 1918.
Svedberg (The). — Colloïd chemistry chemical catalog compagny. Lon-
don, 1924.
Sörensen (S. P. L.). — Studies on proteins. Comptes rendus des travaux
du laboratoire de Carlsberg, t. XII. Copenhague, 1915-1917.
— Conférence sur l'Albumine du blanc d'œuf de poule (faite devant
la Soc. chimique de France, mai 1921).
— Les colloïdes, nos 3, 4, 5, 1927.
Troensegard. — Zeit f. physiol, chim., 1921, CXII, 86-103 ; 1923,
CXXVII, 137-185 ; 1924, CXXXIII, 116-125.
Vlès. — Précis de chimie-physique. Vigot, Paris, 1929.
Vilson (J. A.) et Wilson (W. H.). — J. Am. chem. Soc., t. XI, p. 886,
1918.
Wilson (J. A.). — The chemistry of Leather Manufacture, New-York,
1923.
Vila. — C. R., t. CLXX, 1928, p. 1466.
— C. R., t. CLXXI, 1920, p. 372.
Zsigmondy. — Traité de chimie colloïdale, Traduction de J. Audy,
Dunod, Paris, 1926.
-

